



## **ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

# **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ**

**ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

**Άννα Πολίτη**

**Λάρισα, 2018**

## **Διερεύνηση εναλλακτικών μεταγράφων της πολυ(Α)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης, PARN, στο μεσοθηλίωμα**

ANNA ΠΟΛΙΤΗ

Επιβλέπων καθηγητής: κ. Μπαλατσός Νικόλαος

*Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.*

## **Alternative transcripts of poly (A)-specific ribonuclease, PARN, in mesothelium**

ANNA POLITI

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
- ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ι. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ, ΚΑΘΗΤΗΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
- ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΖΑΡΟΓΙΑΝΝΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## *Ευχαριστίες*

*Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Νικόλαο Μπαλατσό, ο οποίος ήταν υπεύθυνος για την επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας, για τη σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησής της αλλά και κατά τη συγγραφή της. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Σωτήριο Ζαρογιάννη και τον κ. Raj Jagirdar για την πολύτιμη υλική συνεισφορά τους, η οποία ήταν απαραίτητη για την επίτευξη των πειραμάτων μου.*

*Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στον πολύτιμο συνεργάτη μου και υποψήφιο διδάκτορα Διονύσιο Αντωνόπουλο, για την αμέριστη βοήθεια του σε θέματα που αφορούσαν τη διπλωματική μου εργασία, αλλά και σε θέματα εκτός εργαστηρίου. Για τους ίδιους λόγους θέλω να ευχαριστήσω, επίσης, την υποψήφια διδάκτορα Ραφαέλα Μπέτα καθώς και τη φίλη μου Δήμητρα Στεργίου, που καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας, η στήριξη και συμπαράστασή τους, τόσο σε πρακτικό όσο και σε ψυχολογικό επίπεδο, ήταν εξαιρετικά σημαντική και ουσιαστική. Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω και όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και υποψήφιους διδάκτορες για τις πολύτιμες συμβουλές τους, τη βοήθεια και τη συνεργασία.*

## **Περίληψη**

Το εναλλακτικό μάτισμα είναι μια κρίσιμη διεργασία κατά τη γονιδιακή έκφραση, και η βιολογική του σημασία έγκειται στη διεύρυνση των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων. Το 95% των πολυεξονικών γονιδίων στον άνθρωπο κωδικοποιούν για περισσότερα από ένα μετάγραφα, εκ των οποίων, το 80% παράγεται μέσω εναλλακτικού ματίσματος. Η απορρύθμισή του έχειδειχθεί ότι εμπλέκεται στο 1/3 των γενετικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Προκαταρκτικές μελέτες του εργαστηρίου έχουν εντοπίσει ένα εναλλακτικό μετάγραφο της πολυ(Α) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN). Η PARN είναι μια απαδενυλάση με καθοριστικό ρόλο στη σταθερότητα και την αποικοδόμηση ευκαρυωτικών mRNA και μη κωδικοδόντων RNA, και κατά συνέπεια στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση της PARN και του εναλλακτικού μεταγράφου της σε τρεις κυτταρικές σειρές από κακοήθες πλευριτικό μεσοθηλίωμα, καθώς και σε μία μη καρκινική σειρά κυττάρων υπεζωκότα. Παράλληλα, εξετάστηκε η έκφραση ενός microRNA, του miR-1207-5p, το οποίο φαίνεται να ρυθμίζει την έκφραση της PARN. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως τα επίπεδα της PARN, του εναλλακτικού μεταγράφου της, καθώς και του miR-1207-5p διαφοροποιούνται στο πλευριτικό μεσοθηλίωμα και φαίνεται να συνδέονται με τα στάδια επιθετικότητας της νόσου.

### **Λέξεις-κλειδιά:**

*Εναλλακτικό μάτισμα, καρκίνος, PARN, μεσοθηλίωμα, mir-1207-5p*

## **Abstract**

Alternative splicing is a critical process in gene expression, and its biological significance lies in the widening of eukaryotic genomes. 95% of the genes with multiple exons in humans encode for more than one transcript, of which 80% is produced by alternative splicing. Its deregulation has been shown to be involved in 1/3 of genetic diseases, including cancer. Preliminary laboratory studies have identified an alternative transcript of poly (A) specific ribonuclease (PARN). PARN is a deadenylase with a key role in the stability and degradation of eukaryotic mRNAs and non-coding RNAs, and consequently in regulation of gene expression. In the present study the expression of PARN and its alternative transcript in three cell lines from malignant pleural mesothelioma, as well as in a non-cancerous pleural cell line, was studied. At the same time, the expression of a microRNA, miR-1207-5p, which appears to regulate PARN expression, was examined. The results show that levels of PARN, its alternative transcript, and miR-1207-5p differ in pleural mesothelioma and appear to be associated with the stage of aggression of the disease.

### **Keywords:**

*Alternative splicing, cancer, PARN, mesothelium, mir-1207-5p*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη

Abstract

Σελίδα

---

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή - Βασικές έννοιες**

1.1. Εναλλακτικό μάτισμα.....	7
1.1.1. Γενικά.....	7
1.1.2. Ο ρόλος του εναλλακτικού ματίσματος σε φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες.....	9
1.1.3. Εναλλακτικό μάτισμα και καρκίνος.....	11
1.2. Το κακοήθες μεσοθηλίωμα.....	16
1.3. Απαδενυλάσες – Ορισμός, ταξινόμηση και βιολογικές λειτουργίες.....	16
1.4. Η πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN.....	18
1.5. Η ρυθμιστική δράση των microRNAs.....	20
1.6. Σκοπός της εργασίας.....	22

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υλικά και Μέθοδοι**

2.1. Κυτταρικές σειρές.....	23
2.2. Απομόνωση ολικού RNA με το πρωτόκολλο Tri Reagent της Sigma Aldrich.....	23
2.3. Πέψη εκχυλισμάτων RNA με την RQ1 (RNA Qualified) RNase-Free DNase, Promega.....	24
2.4. Παραγωγή cDNA με PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) της Takara.....	25
2.5. Παραγωγή cDNA με Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit της Takara.....	25
2.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....	27
2.7. Ανάλυση προϊόντων qRT-PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....	30
2.8. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blotting).....	32

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αποτελέσματα**

3.1. Αναζήτηση εναλλακτικού μεταγράφου της PARN σε 4 κυτταρικές σειρές.....	35
3.2. Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του mir-1207-5p σε 4 κυτταρικές σειρές.....	42
3.3. Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της PARN και του εναλλακτικού μεταγράφου της σε συνθήκες στέρησης ορού.....	45
3.4. Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του mir-1207-5p σε συνθήκες στέρησης ορού.....	49
3.5. Ανοσοαποτύπωση της PARN σε δείγματα πρωτεϊνών M14k, MSTO, ZL34 και Met5A κυττάρων σε κανονικές συνθήκες και συνθήκες στέρησης ορού.....	51

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Συζήτηση**

Βιβλιογραφία.....	56
-------------------	----

---



## Εισαγωγή – Βασικές έννοιες

### 1.1. Το εναλλακτικό μάτισμα

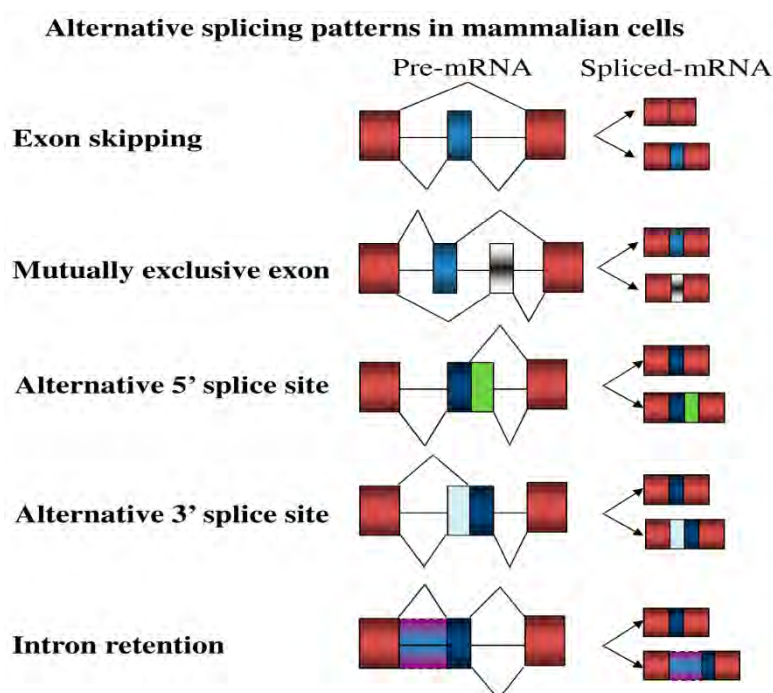
#### 1.1.1. Γενικά

Μια από τις σημαντικές ανακαλύψεις της μοριακής Βιολογίας, είναι ότι η πλειοψηφία των γονιδίων των ευκαρυωτικών οργανισμών και κυρίως αυτών που κωδικοποιούν για mRNA, είναι ασυνεχή. Κατά την έκφραση του mRNA γονιδίων, μεταξύ της μεταγραφής και της μετάφρασής τους, διαμεσολαβεί ένα στάδιο ωρίμανσης στο οποίο γίνεται η αναγνώριση και η αφαίρεση συγκεκριμένων αλληλουχιών από το πρώιμο mRNA (pre-mRNA) και η συρραφή των υπολοίπων, διατηρώντας πάντοτε την αρχική σειρά των τελευταίων. Αυτή η διεργασία καλείται μάτισμα (splicing). Οι περιοχές που παραμένουν στα ώριμα mRNA ονομάζονται εξόνια (exons), ενώ οι περιοχές που πάντα αφαιρούνται ονομάζονται εσώνια ή ιντρόνια (introns). Η διεργασία του ματίσματος καταλύεται μέσω του μηχανισμού του ματισματοσώματος (spliceosome), ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από ~150 πρωτεϊνικές επικράτειες και από πέντε διακριτά πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά (snRNP) σωματίδια, U1, U2, U4/U6 και U5 (Lee and Rio, 2015). Αρχικά, τα snRNPs αναγνωρίζουν και προσδένονται στις θέσεις ματίσματος και στρατολογούν, στη συνέχεια, τις υπόλοιπες υπομονάδες του spliceosome στις συγκεκριμένες θέσεις. Μόλις σχηματιστεί το spliceosome, καταλύει την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του pre-mRNA στα όρια των ιντρονίων, που ακολουθείται από την ένωση των γειτονικών εξονίων (Braunschweig et al., 2013).

Το Human Genome Project έδειξε ότι η πλειοψηφία των ανθρώπινων γονιδίων (~95%) αποτελούνται από περισσότερα του ενός εξόνια (Venter et al., 2001) ενώ, αργότερα, τα δεδομένα που ανακτήθηκαν από το ENCODE έδειξαν πως ~80% των πολυεξονικών γονιδίων που κωδικοποιούν για mRNA, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν εναλλακτικά μετάγραφα μέσω εναλλακτικού ματίσματος (The ENCODE project, 2004). Το εναλλακτικό μάτισμα αποτελεί ένα στάδιο της γονιδιακής έκφρασης κατά το οποίο επιλέγονται τα εξόνια, ή περιοχές τους, που θα συμπεριληφθούν στα αντίστοιχα ώριμα mRNAs, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον του κυττάρου αλλά και στα σήματα που δέχεται (Le KQ et al., 2015). Στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 25.000 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, αλλά ο αριθμός των πρωτεϊνών που μπορούν να παραχθούν εκτιμάται να είναι κατά πολύ μεγαλύτερος (~90.000) (Venter et al., 2001). Η παραπάνω διαφορά οφείλεται στην έκφραση εναλλακτικών μεταγράφων μέσω

διαφόρων μηχανισμών, ένας από τους οποίους είναι το εναλλακτικό μάτισμα. Ως αποτέλεσμα του εναλλακτικού ματίσματος, είναι δυνατό να προκύψουν εκατοντάδες πρωτεΐνες από το ίδιο γονίδιο, οι διαφορές μεταξύ των οποίων μπορεί να κυμαίνονται από μικρές αλλαγές στη ρύθμισή τους, έως και σε ριζικές αλλαγές στη λειτουργία τους. Από τα παραπάνω, λοιπόν, γίνεται κατανοητό ότι ο κύριος ρόλος του εναλλακτικού ματίσματος είναι η διεύρυνση της κωδικοποιητικής ικανότητας του γονιδιώματος.

Οι κατηγορίες του εναλλακτικού ματίσματος που λαμβάνουν χώρα στο σύνολο των ευκαρυωτικών οργανισμών είναι: η παράλειψη εξονίου (exon skipping), τα αμοιβαία αποκλειστικά εξόνια (mutually exclusive exon), η χρήση εναλλακτικής 5' και 3' θέσης ματίσματος (alternative 5' and 3' splice site) και η κατακράτηση ιντρονίου (intron retention) (**Εικόνα 1**) (Kim et al., 2008).



**Εικόνα 1:** Αναπαράσταση των κυριότερων κατηγοριών εναλλακτικού ματίσματος στα κύτταρα θηλαστικών (Lin et al., 2016).

Η παράλειψη εξονίου αποτελεί την πιο κοινή κατηγορία που απαντάται στην πλειοψηφία των συμβάντων εναλλακτικού ματίσματος, και αναφέρεται στην αναγνώριση του εναλλακτικού εξονίου και των δύο γειτονικών του ιντρονίων ως ένα ενιαίο ιντρόνιο, με αποτέλεσμα το εναλλακτικό εξόνιο τελικά να αποκόπτεται από το ώριμο mRNA που παράγεται. Στην περίπτωση των αμοιβαία αποκλειστικών εξονίων, δύο ή περισσότερα γειτονικά εξόνια, δεν συμπεριλαμβάνονται ποτέ μαζί στο ίδιο μετάγραφο, αλλά μεμονωμένα σε διαφορετικά εναλλακτικά μετάγραφα (Ghigna et al., 2008). Οι δύο επόμενες κατηγορίες που αντιστοιχούν στις εναλλακτικές 5' και 3' θέσεις ματίσματος αναφέρονται στην αναγνώριση εναλλακτικών 5' και 3' περιοχών, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την συμπερίληψη εναλλακτικών 5' και 3' θέσεων ματίσματος, αντίστοιχα, στο εξόνιο του ώριμου μεταγράφου. Ο πιο σπάνιος τύπος εναλλακτικού ματίσματος στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι η



κατακράτηση ιντρονίου, κατά τον οποίο ένα ιντρόνιο μικρού μήκους αναγνωρίζεται ως εξόνιο και, έτσι, παραμένει στο ώριμο mRNA.

Εκτός από αυτούς τους μηχανισμούς εναλλακτικού ματίσματος, ο αριθμός των παραγόμενων μορίων mRNA μπορεί επίσης να διευρυνθεί και μέσω της χρήσης εναλλακτικών υποκινητών και των εναλλακτικών θέσεων πολυαδενυλίωσης (Keren et al., 2010). Πολλά ευκαρυωτικά γονίδια περιέχουν πολλαπλούς εναλλακτικούς υποκινητές και η ρύθμιση καθενός από αυτούς υπόκειται σε διαφορετικούς ρυθμιστικούς παράγοντες. Εξ ορισμού, κάθε εναλλακτικός υποκινητής προσδιορίζει μια διαφορετική θέση έναρξης και διαφορετικό πρώτο εξόνιο, και κατά συνέπεια, οδηγεί στην παραγωγή ενός διαφορετικού μεταγράφου. Οι διάφορες ισομορφές μεταγράφων που προέρχονται από ένα γονίδιο με πολλαπλούς υποκινητές διαφέρουν συνήθως μόνο στις περιοχές 5' UTR και μοιράζονται τα ίδια ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (Kornblihtt, 2005). Αναλυτικότερα, αν ο εν λόγω εναλλακτικός υποκινητής βρίσκεται καθοδικά του κύριου υποκινητή, τότε το μετάγραφο που θα προκύψει δεν θα περιέχει κάποιο ή κάποια από τα αρχικά εξόνια, και αντίστοιχα, αν βρίσκεται ανοδικά του κύριου υποκινητή τότε θα συμπεριλαμβάνει πρόσθετα εξόνια στο 5' άκρο του.

Όσον αφορά την εναλλακτική πολυαδενυλίωση, αξίζει να σημειωθεί πως τέτοια συμβάντα απαντώνται πολύ συχνά, καθώς τουλάχιστον το 70% των γονιδίων των θηλαστικών που κωδικοποιούν για mRNA εκφράζουν διάφορες ισομορφές μέσω της χρήσης εναλλακτικών θέσεων πολυαδενυλίωσης (Hoque et al., 2013). Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση συμβαίνει κατά κύριο λόγο στις περιοχές 3' UTR και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή διαφορετικών mRNA που εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στο μήκος των περιοχών αυτών. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι 3' αμετάφραστες περιοχές περιέχουν cis- ρυθμιστικά στοιχεία που εμπλέκονται σε διάφορες πτυχές του μεταβολισμού του mRNA, μπορούμε να συμπεράνουμε πως τα συμβάντα εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης στις περιοχές αυτές μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την μετα-μεταγραφική γονιδιακή ρύθμιση με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένου της διαμόρφωσης της σταθερότητας του mRNA, της μετάφρασης, του κυτταρικού εντοπισμού και της εξαγωγής από τον πυρήνα, ακόμη και του εντοπισμού της κωδικοποιημένης πρωτεΐνης (Tian and Manley, 2016).

### **1.1.2. Ο ρόλος του εναλλακτικού ματίσματος σε φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες**

Ο ρόλος του εναλλακτικού ματίσματος αποδίδεται στην ενίσχυση της ικανότητας κωδικοποίησης του γονιδιώματος και κατά συνέπεια της πολυπλοκότητας του πρωτεώματος. Οι πρωτεϊνικοί επίτοποι που κωδικοποιούνται από εναλλακτικά εξόνια βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε αναδιπλωμένες περιοχές (Wang et al., 2005), ή σε μη δομημένες περιοχές στο εξωτερικό των πρωτεϊνών (Romero et al., 2006). Κατά συνέπεια, τα εναλλακτικά εξόνια δεν επηρεάζουν τη γενική πρωτεϊνική δομή αλλά δομές στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Τα δεδομένα αυτά, λοιπόν, υποδηλώνουν πως η κυριότερη λειτουργία του εναλλακτικού ματίσματος είναι να τροποποιήσει,

αλλά όχι να αλλάξει ριζικά τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης. Υπάρχουν και εξαιρέσεις στον συγκεκριμένο κανόνα, κατά τις οποίες εναλλακτικά μετάγραφα μεταφράζονται σε πρωτεΐνες με εντελώς διαφορετική δομή και λειτουργία ([Brinkman, 2004](#)). Το εναλλακτικό μάτισμα, όπως άλλωστε και όλα τα υπόλοιπα στάδια της γονιδιακής έκφρασης, παίζουν ρόλο σε όλες τις κυτταρικές διεργασίες. Ορισμένες κυτταρικές διεργασίες που επηρεάζονται από τον μηχανισμό αυτό, παρατίθενται παρακάτω:

- ❖ Το εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να ρυθμίσει τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών, μέσω των περιοχών κυτταρικού εντοπισμού - κυτταρικής προσκόλλησης. Πιο συγκεκριμένα, ένα γονίδιο είναι δυνατό να παράγει 2 πρωτεΐνες που να διαφέρουν στη συγγένειά τους για μεμβρανικούς υποδοχείς/ λιπίδια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο της λιπίνης που κωδικοποιεί για δύο εναλλακτικές ισομορφές, μία κυτταροπλασματική και μία πυρηνική. Η κυτταροπλασματική ισομορφή έχει ενζυμική δράση σε αντίθεση με την πυρηνική, η οποία δρα ως μεταγραφικός παράγοντας. Η μόνη διαφορά τους είναι ότι περιλαμβάνεται ένα εξόνιο στο μετάγραφο που κωδικοποιεί την πυρηνική ισομορφή, το οποίο κωδικοποιεί για έναν επίτοπο στη δομή της πρωτεΐνης που αποτελεί σήμα πυρηνικού εντοπισμού ([Han and Carman, 2010](#)). Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, η δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης απλά τροποποιείται και δεν αλλάζει ριζικά.
- ❖ Το εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να λειτουργήσει ως ένας on/off διακόπτης για διάφορα γονίδια που κωδικοποιούν για προ-αποπτωτικά ή αντι-αποπτωτικά ένζυμα, και κατά συνέπεια, τα εναλλακτικά μετάγραφα είναι δυνατό να ρυθμίσουν θετικά ή αρνητικά την απόπτωση ([Lin et al., 2016](#)). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο PUMA (ή BBC3), που επάγει την εξαρτώμενη ή ανεξάρτητη από τον καταστολέα όγκου p53 απόπτωση ([Hikisz and Kiliańska, 2012](#)). Το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου PUMA οδηγεί στην έκφραση τεσσάρων εναλλακτικών μεταγράφων (α,β,γ και δ). Η διαφορά τους είναι ότι τα PUMA-α και -β μετάγραφα περιλαμβάνουν την περιοχή που κωδικοποιεί για την BH3 περιοχή στις πρωτεϊνικές ισομορφές α και β, ενώ τα μετάγραφα PUMA-γ και -δ όχι. Όλες οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες περιέχουν μία περιοχή BH3 απαραίτητη για το διμερισμό τους με άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, και μέσω της οποίας αλληλεπιδρούν και αναστέλλουν τη δράση των αντι-αποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών. Η περιοχή αυτή, λοιπόν, στις ισομορφές -α και -β παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της απόπτωσης και οι ανωμαλίες στο μάτισμα των PUMA μεταγράφων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ή την ενίσχυση της απόπτωσης, λόγω συμπερίληψης ή αποκλεισμού της BH3 περιοχής στις εναλλακτικές ισομορφές που θα παραχθούν ([Nakano and Vousden, 2001](#); [Dlamini et al., 2015](#)).
- ❖ Το εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να επηρεάσει και τη δράση μεταγραφικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, η παράλειψη εναλλακτικών εξονίων που κωδικοποιούν για περιοχές πρόσδεσης του DNA, οδηγεί σε μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν χάσει την ικανότητά τους να προσδένονται σε υποκινητές. Στην περίπτωση αυτή, τέτοιες ισομορφές φαίνεται να είναι συνήθως

ανενεργές ή/και να δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές (Goodson et al., 2005), γεγονός που αποτελεί ίσως και την πιο ριζική αλλαγή στη λειτουργία των παραγόμενων ισομορφών μέσω εναλλακτικού ματίσματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα FOXP2. Το συγκεκριμένο γονίδιο μπορεί να εκφράσει δυο ισομορφές, των οποίων η διαφορά έγκειται στην παράλειψη ενός εναλλακτικού εξονίου που κωδικοποιεί την περιοχή πρόσδεσης στο DNA. Η ανενεργή ισομορφή, λοιπόν, που δεν περιέχει το συγκεκριμένο εξόνιο, έχει χάσει την ικανότητά του να προσδένεται στο DNA και κατ' επέκταση να ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων. Αντίθετα, μπορεί να εξέλθει στο κυτταρόπλασμα και να σχηματίσει διμερή με την ενεργή ισομορφή, αποδίδοντας έτσι την αντίθετη ρυθμιστική δράση σε σχέση με την ενεργή ισομορφή (Vernes and Fisher, 2009).

- ❖ Το εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να τροποποιήσει και τις ιδιότητες των ενζύμων. Η πιο μελετημένη κατηγορία ενζύμων που επηρεάζεται από τον συγκεκριμένο μηχανισμό είναι οι κινάσες, στις οποίες μία παράλειψη ενός εναλλακτικού εξονίου συνήθως καταργεί τη δράση τους, λόγω της παράλειψης πρωτεϊνικών επιτόπων από το ενεργό τους κέντρο. Το γονίδιο της κυτταροπλασματικής φωσολιπάσης A2β (cytosolic phospholipase A2beta) μπορεί να εκφράσει, μεταξύ άλλων, και μία ισομορφή που έχει διαφορετικό υπόστρωμα. Η θεμελιώδης αυτή διαφορά οφείλεται στη χρήση ενός εναλλακτικού εξονίου που κωδικοποιεί για διαφορετικό ενεργό κέντρο, το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης (Ghosh et al., 2006).
- ❖ Σημαντικό, επίσης, κρίνεται το γεγονός ότι το εναλλακτικό μάτισμα δεν μπορεί να συμβεί μόνο σε κωδικές περιοχές του pre-mRNA, αλλά και σε αμετάφραστες περιοχές αυτού. Κατ' επέκταση, ο μηχανισμός αυτός μπορεί άμεσα να επηρεάσει τη ρύθμιση της σταθερότητας και του μεταβολισμού του mRNA από διαφορετικά microRNAs, καθώς μπορεί να λάβει χώρα σε περιοχές πρόσδεσης των microRNAs, που συνήθως εντοπίζονται στις περιοχές UTR των mRNAs. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο SLC11A2, που κωδικοποιεί για έναν μεταφορέα δισθενών μετάλλων (DMT1). Η έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου του DMT1 που στερείται ενός IRE στοιχείου (iron regulatory element) από την 3' UTR περιοχή του, βρίσκεται υπό την ρύθμιση του miR-Let-7d και έχει βρεθεί πως η υπερέκφραση του miR-Let-7d μειώνει την έκφραση του DMT1-IRE σε επίπεδα mRNA και πρωτεϊνών, σε K562 και HEL κύτταρα (Andolfo et al., 2010).

### 1.1.3. Εναλλακτικό μάτισμα και καρκίνος

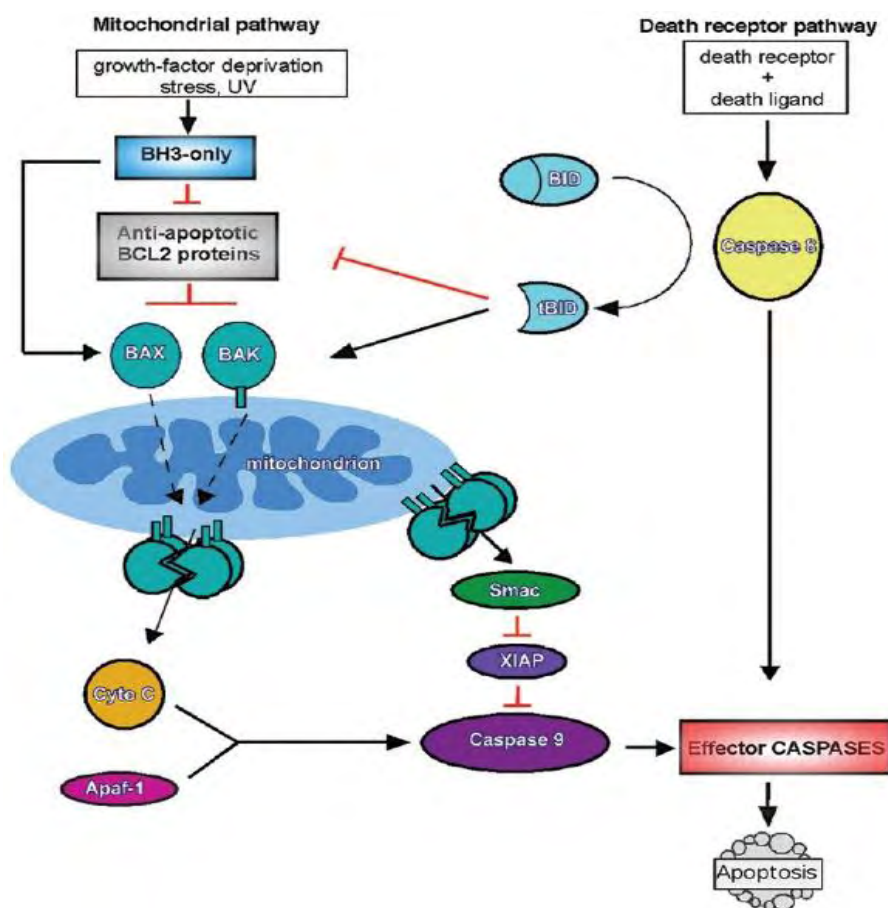
Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το εναλλακτικό μάτισμα εμπλέκεται σε πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται και η κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση. Επομένως, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η αποτυχία της σωστής ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος μπορεί να οδηγήσει σε ασθένεια, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου (Wojtuszkiewicz et al., 2015). Ο καρκίνος αποτελεί μια πολυπαραγοντική ασθένεια που προϋποθέτει τη

συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών ανωμαλιών, και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του, ωθεί τα κύτταρα στην απόκτηση των εξής οκτώ γνωρισμάτων: τη διατήρηση της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης πολλαπλασιασμού, την αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο, την αποφυγή σημάτων καταστολής της κυτταρικής αύξησης, την ικανότητα να εισβάλουν στους φυσιολογικούς ιστούς και να οδηγούν σε μεταστάσεις, την αναπαραγωγική αθανασία, τη δυνατότητα επαγωγής της αγγειογένεσης, τη δυνατότητα να επαναπρογραμματίζουν το μεταβολισμό ενέργειας και τέλος, την αποφυγή αναγνώρισης και καταπολέμησής του από το ανοσοποιητικό σύστημα (Hanahan et Weinberg, 2011).

Είναι, πλέον, γνωστό ότι η απορρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος εμπλέκεται και στα 8 χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου (Oltean and Bates, 2013). Τα καρκινικά κύτταρα απορρυθμίζουν το εναλλακτικό μάτισμα συγκεκριμένων γονιδίων, με σκοπό τη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων μεταγράφων και την παραγωγή ισομορφών πρωτεϊνών που σχετίζονται με μία ογκογόνο δράση. Πολλά εναλλακτικά μετάγραφα που εκφράζονται στο καρκίνο και όχι στα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα, έχει βρεθεί ότι παίζουν ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην αγγειογένεση και τη μετάσταση (Hagen and Lodomery, 2012; Oltean and Bates, 2014).

Όπως προαναφέρθηκε, ένα χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι η αποφυγή της απόπτωσης. Η απόπτωση είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο τα κύτταρα εκτελούν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ως απόκριση σε εσωτερικά ή εξωτερικά ερεθίσματα. Έτσι, η απενεργοποίηση ή απορρύθμιση των αποπτωτικών μονοπατιών μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη του όγκου και σε αντίσταση στη χημειοθεραπεία (Shultz et Chalfant, 2007). Στο πλαίσιο αυτό, λοιπόν, τα καρκινικά κύτταρα μεταβάλουν το πρότυπο εναλλακτικού ματίσματος γονιδίων που ελέγχουν την απόπτωση. Το Bcl-x είναι ένα μέλος της οικογένειας Bcl-2 και ένας σημαντικός ρυθμιστής της απόπτωσης, που επάγεται από μια πληθώρα ερεθισμάτων (Boise et al., 1995). Το γονίδιο Bcl-x κωδικοποιεί, μεταξύ άλλων, για δύο κύριες ισομορφές μέσω εναλλακτικού ματίσματος, την αντι-αποπτωτική Bcl-x<sub>L</sub> (long isoform) και την προ-αποπτωτική Bcl-x<sub>S</sub> (short isoform) (Chalfant et al., 2002). Η Bcl-x<sub>S</sub> είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης μίας εναλλακτικής 5' θέσης ματίσματος στο εξόνιο 2 του Bcl-x pre-mRNA, ενώ η Bcl-x<sub>L</sub> ισομορφή παράγεται όταν ολόκληρο το εξόνιο 2 περιλαμβάνεται στο ώριμο μετάγραφο. Η Bcl-x<sub>L</sub> αναστέλλει την απόπτωση με διάφορους μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, μπορεί να συνδεθεί άμεσα με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax (μέσω της BH3 περιοχής) και να παρεμποδίσει τη δράση της, όταν αυτή δεν είναι προσδεμένη με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (MOM), ή να προκαλέσει τη μετατόπιση της Bax στο κυτταρόπλασμα, όταν είναι συνδεδεμένη με τη MOM (MOMP) ως απόκριση σε ερεθίσματα θανάτου. Η Bcl-x<sub>L</sub> μπορεί επίσης να παρεμποδίσει και τον tBid, έναν ενεργοποιητή του Bax (Edlich et al., 2011). Όλες αυτές οι Bcl-x<sub>L</sub>-μεσολαβούμενες δράσεις παρεμποδίζουν τη διαπερατότητα της MOM και κατά συνέπεια, οδηγούν στην πρόληψη της απόπτωσης (Shamas-Din et al., 2013) (Εικόνα 2). Σε πολλούς καρκίνους που έχουν αποκτήσει αντίσταση στη χημειοθεραπεία έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα της Bcl-x<sub>L</sub> ισομορφής (Gardner, 2004). Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η

υπερπαραγωγή της Bcl-x<sub>L</sub> ισομορφής σε κύτταρα προκαλεί αντοχή σε αποπτωτικά ερεθίσματα και ότι συνεργάζεται με ογκογονικούς παράγοντες (π.χ. c-Myc) στην ογκογένεση (Pena et al., 1999). Αντίθετα, η Bcl-x<sub>S</sub> ισομορφή προωθεί την απόπτωση δεσμεύοντας και αναστέλλοντας την Bcl-x<sub>L</sub>, και απελευθερώνοντας έτσι την προ-αποπτωτική Bak πρωτεΐνη (Plötz et al., 2012). Η αλλαγή του εναλλακτικού ματίσματος του Bcl-x προς το σχηματισμό του Bcl-x<sub>S</sub> μεταγράφου, επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (Mercatante et al., 2001).



**Εικόνα 2:** Επισκόπηση των αποπτωτικών οδών: ο υποδοχέας θανάτου και οι μιτοχονδριακές οδοί. Η οδός του υποδοχέα θανάτου ξεκινά από μέλη της υπερικογενείας παραγόντων νέκρωσης όγκου, τα οποία συνδέονται με τους υποδοχείς τους και προκαλούν την ενεργοποίηση της κασπάσης 8. Η μιτοχονδριακή οδός ελέγχεται από την οικογένεια πρωτεϊνών BCL2 (πχ. Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-x<sub>S</sub>, BAX, BAK) που ρυθμίζουν τη MOMP. η οποία μόλις συμβεί επιτρέπει την απελευθέρωση των διαμεμβρανικών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (Smac, cytochrome c) που διευκολύνουν την ενεργοποίηση των κασπασών, και τελικά οδηγούν σε απόπτωση. Η αντι-αποπτωτική Bcl-x<sub>L</sub> μπορεί να συνδεθεί με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax και να αναστείλει τη δράση της ή να παρεμποδίσει τον ενεργοποιητή της Bax (tBid), παρεμποδίζοντας έτσι τη MOMP και οδηγώντας στην πρόληψη της απόπτωσης (Dai et al., 2016).

Η απορρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος, επίσης, έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάσταση. Η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), είναι μια αναπτυξιακή διεργασία κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν την κυτταρική προσκόλληση και την πολικότητά τους και απελευθερώνονται στο παρέγχυμα. Αντίθετα, κατά τη μεσεγχυματική προς επιθηλιακή μετάβαση (MET) τα μεσεγχυματικά κύτταρα που είχαν απελευθερωθεί στο παρέγχυμα, στρατολογούνται

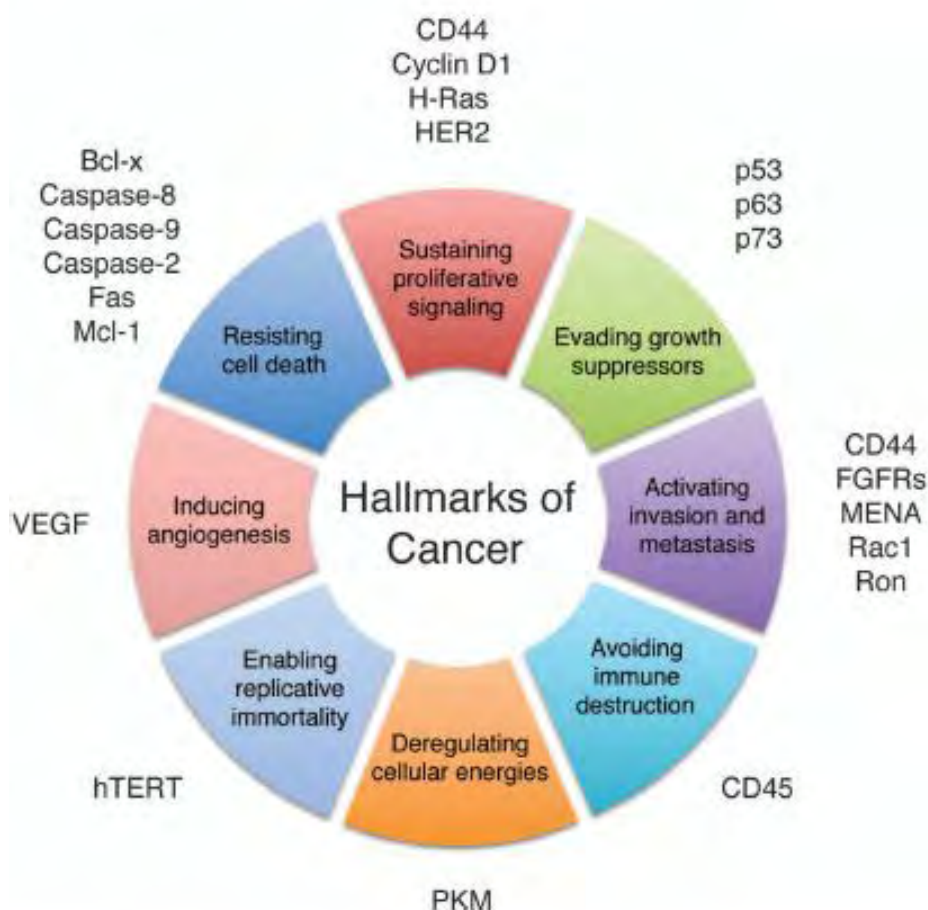


σε έναν ιστό, ανακτούν την πολικότητά τους και την ικανότητά τους να προσκολλώνται, και γίνονται μέρος του επιθηλίου (Liu and Cheng, 2015). Τα καρκινικά κύτταρα, μέσω της διαδοχικής ενεργοποίησης των (EMT) και (MET) μπορούν να επάγουν τη μετάσταση. Ένα παράδειγμα γονιδίου, του οποίου το εναλλακτικό μάτισμα παίζει ρόλο στη μετάσταση, είναι το MST1R. Το γονίδιο MST1R κωδικοποιεί για τον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης RON, ο οποίος αποτελείται από μια  $\alpha$ -αλυσίδα 40kDa και μια  $\beta$ -αλυσίδα 145kDa συνδεδεμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η έκφραση του RON παρατηρείται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα και σε πληθυσμούς μακροφάγων, όπου βρίσκεται ενσωματωμένος στην κυτταρική μεμβράνη και ενεργοποιείται με την πρόσδεση του παράγοντα ενεργοποίησης μακροφάγων (MSF) στο εξωκυττάριο τμήμα (Morrison et al., 2004). Η ενεργοποίησή του οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση μονοπατιών μεταγωγής σήματος που προωθούν τη μετανάστευση. Κατά το εναλλακτικό μάτισμα του RON pre-mRNA, η παράλειψη του εξονίου 11 οδηγεί στην παραγωγή της  $\Delta$ RON ισομορφής που στερείται 49 αμινοξέα από τη  $\beta$ -αλυσίδα της. Η  $\Delta$ RON είναι μια ιδιосуστατικά ενεργή ισομορφή του υποδοχέα RON που ενεργοποιεί διαρκώς μονοπάτια μεταγωγής σήματος ακόμη και απουσία του παράγοντα MSF. Στον καρκίνο, το εναλλακτικό μάτισμα του RON απορρυθμίζεται και η  $\Delta$ RON ισομορφή υπερπαράγεται, συμβάλλοντας έτσι στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Elliott and Ladomery, 2016).

Αναμφισβήτητα, το πιο θεμελιώδες χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι η ικανότητά τους να διατηρούν την ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, που επιτυγχάνεται μέσω διατήρησης της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης και διαφυγής των καταστολέων κυτταρικής ανάπτυξης. Στον καρκίνο του μαστού το γονίδιο BIN1 κωδικοποιεί για δύο εναλλακτικά μετάγραφα, το BIN1 και το BIN1+12a. Το BIN1+12a μετάγραφο περιλαμβάνει το εναλλακτικό εξόνιο 12a, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη που παράγει να μην μπορεί να προσδεθεί στο πρωτο-ογκογονίδιο MYC (Anczukow et al., 2012). Αντίθετα, η πρωτεΐνη BIN1 αλληλεπιδρά με το MYC και καταστέλλει την ογκογόνο δράση του. Η συμπερίληψη, όμως, του εξονίου 12a στο εναλλακτικό μετάγραφο του BIN1 παρεμποδίζει τη δέσμευση του MYC και κατά συνέπεια, καταργεί την ογκοκατασταλτική δράση του BIN1. Έναν άμεσο ρόλο στην εξάπλωση του καρκίνου διαδραματίζει, επίσης, και το εναλλακτικό μάτισμα του ογκοκατασταλτικού γονιδίου KLF6, που οδηγεί στην έκφραση ενός εναλλακτικού μεταγράφου που περιλαμβάνει το εξόνιο 1a (Shi et al., 2008). Το συγκεκριμένο εξόνιο διαθέτει μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού και η συμπερίληψή του στο ώριμο μετάγραφο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας πρωτεΐνης που στερείται της θέσης πρόσδεσης του DNA. Κατά συνέπεια, δεν μπορεί να δράσει ως καταστολέας όγκου, σε αντίθεση με την αγρίου τύπου KLF6.

Το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του ενζύμου PKM, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή 2 αμοιβαία αποκλειστικών ισομορφών (Clower et al., 2010; David et al., 2010). Η PKM1 ισομορφή, που δημιουργείται από την συμπερίληψη του εξονίου 9, προάγει την οξειδωτική φωσφορυλίωση, ενώ η PKM2 ισομορφή που δημιουργείται με την ενσωμάτωση του εξονίου 10, προάγει την αερόβια γλυκόλυση και το 'Warburg effect'. Η PKM2 ισομορφή είναι ζωτικής σημασίας για τα ταχέως αναπτυσσόμενα

κύτταρα και η έκφρασή της είναι αρκετά υψηλή κατά την εμβρυογένεση. Στα καρκινικά κύτταρα, η PKM2 υπερεκφράζεται και η υπερέκφρασή της ελέγχεται από την ογκοπρωτεΐνη c-Myc. Η c-Myc ενεργοποιεί τη μεταγραφή των ετερογενών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (hnRNPs) I, A1 και A2, οι οποίες δεσμεύουν και καταστέλλουν τις αλληλουχίες RNA που κωδικοποιούν το εξόνιο 9. Ως αποτέλεσμα, παρεμποδίζεται η δημιουργία του PKM1 μεταγράφου, ενώ παράλληλα επιτυγχάνεται η έκφραση του PKM2 μεταγράφου (David et al., 2010). Τα καρκινικά κύτταρα, λοιπόν, μπορούν να μεταβάλλουν το προφίλ ματίσματος του mRNA του συγκεκριμένου ενζύμου ώστε να παράγεται μόνο η PKM2 ισομορφή, με σκοπό να επαναπρογραμματίζουν τον ενεργειακό μεταβολισμό τους και να προωθούν την ανάπτυξη, την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Συμπερασματικά, είναι πλέον ξεκάθαρο πως κάθε ένα από τα «χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου» συνδέεται με μία αλλαγή στη διεργασία του ματίσματος, προς την εμφάνιση ενός πιο επιθετικού επεμβατικού φαινοτύπου καρκίνου.



**Εικόνα 3:** Η απορρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος εμπλέκεται σε όλα τα «χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου». Δίπλα από κάθε χαρακτηριστικό παρουσιάζονται διάφορα παραδείγματα γονιδίων, των οποίων το εναλλακτικό μάτισμα ελέγχει αντίστοιχα έναν καρκινικό φαινότυπο (Liu and Cheng, 2015).

## 1.2. Το κακοήθες πλευριτικό μεσοθηλίωμα

Το κακοήθες πλευριτικό μεσοθηλίωμα είναι μία σπάνια και πολύ επιθετική μορφή καρκίνου, που προκύπτει από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των μεσοθηλιακών κυττάρων του υπεζωκότα<sup>1</sup> (Remon et al., 2015). Το 80% των περιπτώσεων κακοήθους μεσοθηλιώματος προέρχεται από τον μετασχηματισμό των μεσοθηλιακών κυττάρων στον υπεζωκότα και έχει βρεθεί πως υπάρχει μεγάλη αιτιώδη συνάφεια με την έκθεση στον αμίαντο. Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους ο αμίαντος προκαλεί το κακοήθες μεσοθηλίωμα παραμένουν άγνωστοι.

Ιστολογικά, το μεσοθηλίωμα ταξινομείται σε τρεις υποτύπους: το επιθηλιοειδές μεσοθηλίωμα, που αποτελεί περίπου το 60% των μεσοθηλιωμάτων, το σαρκωματώδες μεσοθηλίωμα, το οποίο χαρακτηρίζεται μορφολογικά από ατρακτοειδή κύτταρα και αποτελεί περίπου το 20% των περιπτώσεων, και το διφασικό μεσοθηλίωμα, που αποτελεί έναν συνδυασμό επιθηλιοειδούς και σαρκωματώδους μεσοθηλιώματος και αναφέρεται αντίστοιχα ως διφασικό-επιθηλιοειδές (biphasic-E) ή διφασικό-σαρκωματώδες (biphasic-S), ανάλογα με το αν κυριαρχούν τα επιθηλιοειδή ή τα σαρκωματώδη κύτταρα (Attanoos and Gibbs, 1997; WHO, 2015). Επιπλέον, έχειδειχθεί πως η επιβίωση των ασθενών με μεσοθηλίωμα σχετίζεται άμεσα με τον ιστολογικό υπότυπο, και πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη επιβίωση (12-27 μήνες) αποδίδεται σε ασθενείς με επιθηλιοειδή μεσοθηλιώματα και η χειρότερη (7-18 μήνες) σε ασθενείς με σαρκωματώδη, ενώ οι διφασικοί όγκοι φαίνεται να συσχετίζονται με ενδιάμεσα αποτελέσματα επιβίωσης (8-21 μήνες) (Health and Social Care Information Centre, 2014).

## 1.3. Απαδενυλάσες –Ορισμός, ταξινόμηση και βιολογικές λειτουργίες

Οι απαδενυλάσες είναι ένζυμα που αποικοδομούν την ουρά πολυ(A) των mRNAs με κατεύθυνση 3'→5', απελευθερώνοντας 5'-AMP. Η τροποποίηση του μήκους της πολυ(A) ουράς παρέχει ένα εξαιρετικά ρυθμιζόμενο μέσο για τον έλεγχο σχεδόν κάθε σταδίου του κύκλου ζωής του mRNA (Yan YB, 2014). Η σημασία, λοιπόν, της ρύθμισης του μήκους της στις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, υπογραμμίζεται από την ύπαρξη πολλών διαφορετικών απαδενυλασών, ο αριθμός των οποίων σε κάθε οργανισμό αυξάνεται όσο ανεβαίνουμε στην εξελικτική κλίμακα (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Όλες οι γνωστές απαδενυλάσες είναι  $Mg^{2+}$ -εξαρτώμενα ένζυμα που μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες, την DEDD και την EEP υπερ-οικογένεια εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών, με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο (Goldstrohm and Wickens, 2008). Η DEDD υπερ-οικογένεια έχει λάβει το όνομά της από τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ των τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης, και τα οποία συντονίζουν τα ιόντα  $Mg^{2+}$  (Zuo and Deutscher, 2001). Στα μέλη της οικογένειας αυτής συγκαταλέγονται η απαδενυλάση

---

<sup>1</sup> λεπτό στρώμα ιστού που καλύπτει τη θωρακική κοιλότητα και τους πνεύμονες



POP2 (γνωστή και ως CAF1), η CAF1Z, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση(PARN), και οι οικογένειες των PAN2 απαδενυλασών. Από την άλλη πλευρά, η υπερ-οικογένεια EEP περιλαμβάνει απαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους, και χαρακτηριστικά παραδείγματα ενζύμων της κατηγορίας αυτής είναι οι απαδενυλάσες Nocturnin, CCR4 και Angel (Dlakic, 2000).

Αξίζει να σημειωθεί πως το φάσμα των απαδενυλασών ποικίλει μεταξύ των ειδών. Συγκεκριμένα, τα μέλη των οικογενειών POP2, CCR4, PAN2 και ANGEL είναι παρόντα σε όλους τους ευκαρυώτες, ενώ υπάρχουν άλλες απαδενυλάσες που είναι λιγότερο συντηρημένες, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της *Drosophila melanogaster*, η οποία στερείται τόσο της PARN όσο και της CAF1Z. Η μεγάλη αυτή ποικιλότητα, λοιπόν, των απαδενυλασών αποδίδει αρκετά πλεονεκτήματα και υποδηλώνει πως πιθανότατα συγκεκριμένες απαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs, επιτάσσοντας τον έλεγχο τους στη δραστικότητα ενός μόνο ενζύμου. Από την άλλη μεριά, όμως, είναι δυνατόν πολλαπλές απαδενυλάσες να μπορούν να δράσουν στο ίδιο mRNA, με διακριτές αλλά παράλληλα και επικαλυπτόμενες λειτουργίες (Goldstrohm and Wickens, 2008).

Οι απαδενυλάσες όπως αναφέρθηκε, αποικοδομούν την πολύ(A) ουρά των mRNAs και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην διαδικασία καταστολής της μετάφρασης και της αποικοδόμησης των mRNA-στόχων γενικότερα. Επιτελούν όμως, παράλληλα, και ποικίλες βιολογικές λειτουργίες. Αρχικά, κάποια από τα ένζυμα αυτά είναι απαραίτητα για τη βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάξεις άλλων απαδενυλασών συνδέονται άμεσα με την εμφάνιση συγκεκριμένων φαινοτύπων. Έπειτα, αρκετές απαδενυλάσες συμπεριλαμβανομένου της PARN του *Xenopus laevis* και της *A. thaliana*, της CCR4 της *D. Melanogaster* και της CCF-1 του *C. elegans*, είναι απαραίτητες κατά την πρώιμη ανάπτυξη (Korner et al., 1998; Molin and Puisieux, 2005; Morris et al., 2005; Chiba et al., 2004), ενώ άλλες απαιτούνται για τη γονιμότητα. Σημαντικός, επίσης, κρίνεται ο ρόλος τέτοιων ενζύμων και στη φυσιολογία των οργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, η αποσιώπηση της Cnot7 σε ποντίκια οδήγησε στην αύξηση της οστικής τους μάζας, που αποδίδεται στον αυξημένο σχηματισμό οστού (Washio-Oikawa et al., 2007). Επιπλέον, οι απαδενυλάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στον έλεγχο της μεταβολικής ομοιόστασης, καθώς έχει παρατηρηθεί πως τα ποντίκια που στερούνται της Nocturnin, λαμβάνουν λιγότερο σωματικό βάρος και λίπος σε σύγκριση με τα ποντίκια που τη διαθέτουν, κάτω από ίδιες συνθήκες διατροφής και συμπεριφοράς (Green et al., 2007).

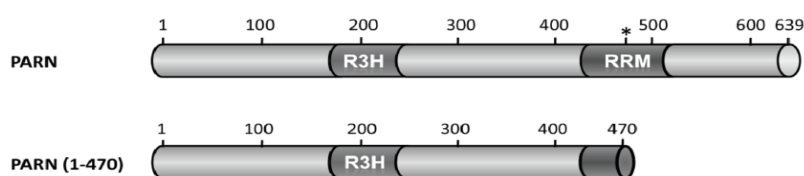
Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί πως συνθήκες ανεξέλεγκτης απαδενυλίωσης θα οδηγούσαν στην καταστροφή και τον θάνατο του κυττάρου. Αυτό έγκειται στο γεγονός ότι τα σταθερά και μεταγραφικά ενεργά mRNAs θα πρέπει να προστατεύονται από την απαδενυλίωση, ενώ αντίθετα, τα ασταθή και μη φυσιολογικά mRNAs θα πρέπει να απαδενυλιώνονται και να αποικοδομούνται (Lejeune and Maquat, 2003). Η ρύθμιση της δραστικότητας των ενζύμων απαδενυλίωσης, κατά συνέπεια, κρίνεται αναγκαία και θεμελιώδους σημασίας.

#### 1.4. Η πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN

Η πολυ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN, αρχικά απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε σε κύτταρα θηλαστικών (Åström et al., 1992; Körner et al., 1997). Η PARN καταλύει την ειδική απομάκρυνση υπολειμμάτων αδενοσίνης από πολυ(Α) ουρές με κατεύθυνση 3'→5' και η αποτελεσματική δραστηριότητα του ενζύμου αυτού, απαιτεί την ύπαρξη μιας ελεύθερης 3'- υδροξυ ομάδας στον RNA-στόχο (Wu et al., 2005). Επιπλέον, είναι συντηρημένη σχεδόν σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου των φυτών και του ανθρώπου, ωστόσο απουσιάζει από τον *S.cerevisiae* και την *D. Melanogaster*, γεγονός που υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη απαδενυλάση δεν απαιτείται σε όλους τους ευκαρυώτες και η δραστηριότητά της είναι πιθανό να αντικαθίσταται από ένα διαφορετικό ένζυμο απαδενυλίωσης, όπως το POP2 που εντοπίζεται και στους δύο αυτούς οργανισμούς (Parker and Song, 2004; Opyrchal et al., 2005).

Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο γνωστές λειτουργικές ισομορφές της PARN, μια μεγάλη πυρηνική μήκους 639 αμινοξέων και μοριακού βάρους 74kDa (Körner et al., 1997), και μια κυτταροπλασματική 54 kDa (62 kDa στον *Xenopus laevis*) (Martinez et al., 2000; Copeland and Wormington, 2001). Η βραχύτερη ισομορφή πιστεύεται ότι αποτελεί πρωτεολυμένο παράγωγο της ισομορφής πλήρους μήκους, και από την οποία απουσιάζει το εύκαμπτο καρβοξυτελικό άκρο. Αυτή η περιοχή περιέχει την NLS (nuclear localization signal) αλληλουχία που είναι υπεύθυνη και για την μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα, γεγονός που αποδίδει και τον διαφορετικό κυτταρικό εντοπισμό στις δύο ισομορφές.

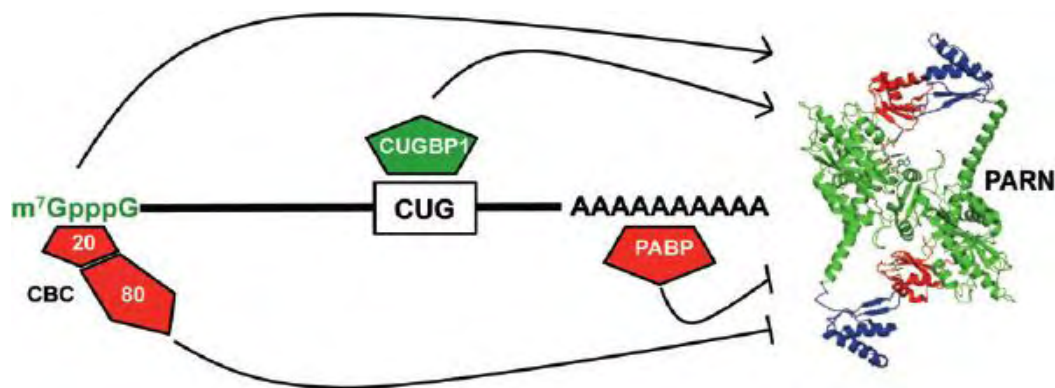
Αξίζει να σημειωθεί πως η PARN είναι η μόνη απαδενυλάση που είναι γνωστό ότι προσδένεται άμεσα στην πολυ(Α) ουρά αλλά και στην καλύπτρα 5' (Martinez et al., 2000; Nilsson et al., 2007). Η αλληλουχία της PARN περιέχει τρεις χαρακτηριστικές περιοχές (Copeland and Wormington, 2001): μια δομική περιοχή νουκλεάσης που είναι υπεύθυνη για την καταλυτική δράση του ενζύμου (1-177 και 246-391), και δυο περιοχές με RNA-συνδεόμενες ιδιότητες, την R3H (178-245) και την RRM (437-510) (Εικόνα 4). Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή νουκλεάσης περιέχει τέσσερα καταλυτικά αμινοξέα (Asp28, Glu30, Asp292, Asp382) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δομή του ενεργού κέντρου, η R3H περιοχή είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του ενζύμου με το υπόστρωμά του την πολυ(Α) ουρά και η RRM περιοχή απαιτείται τόσο για την πρόσδεση στην πολυ(Α) ουρά όσο και για την αναγνώριση και πρόσδεση στην 5' καλύπτρα (Wu et al., 2005; Nilsson et al., 2007).



**Εικόνα 4:** Σχηματική αναπαράσταση της ανθρώπινης PARN και των ρυθμιστικών της περιοχών. Παρουσιάζονται οι δύο ισομορφές, πλήρους μήκους και κολοβωμένης PARN (1-470), καθώς και οι δύο RNA-binding περιοχές, R3H και RRM. Η περιοχή νουκλεάσης (1-177 και 246-391) πλαισιώνει την περιοχή R3H (178-245) και ο αστερίσκος υποδηλώνει το αμινοξύ Trp475, που είναι σημαντικό για την πρόσδεση του καλύμματος (Balatsos et al., 2012).

Όπως προαναφέρθηκε, η PARN αποτελεί μέλος της DEDD οικογένειας εξωνουκλεασών, που περιέχουν συντηρημένα κατάλοιπα Asp-Glu-Asp-Asp στο ενεργό τους κέντρο (Goldstrohm and Wickens, 2008). Τυχόν μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα τέσσερα αυτά αμινοξέα, έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση της συνολικής δραστηριότητας του ενζύμου (Godwin et al., 2012). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει πως η PARN έχει δομή ομοδιμερούς (Wu et al., 2005). Βιοχημικές μελέτες έδειξαν πως η ενεργότητα της PARN εξαρτάται από δισθενή μεταλλικά ιόντα και πως η μεγαλύτερη δραστηριότητα αποδίδεται παρουσία ιόντων  $Mg^{2+}$ , τα οποία πιθανώς βρίσκονται στο ενεργό κέντρο παίζοντας καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης. Επιπρόσθετα, τα ιόντα  $Mg^{2+}$  έχει παρατηρηθεί πως παίζουν ρόλο και στη σταθερότητα του ενζύμου, καθώς επίσης και στην προστασία της ενεργού περιοχής του ενάντια στη μετουσίωση, σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών (Liu et al., 2007).

Η ρύθμιση της δραστηριότητας της PARN επιτελείται από διάφορους trans RNA-συνδεόμενους παράγοντες, οι οποίοι δεσμεύονται στα cis-δραστικά στοιχεία και κατά συνέπεια μπορούν να στρατολογούν, να διεγείρουν ή να αναστέλλουν την PARN (Balatsos et al., 2012). Ορισμένοι μηχανισμοί ρύθμισης της δραστηριότητας του ενζύμου αποτελούν οι εξής: α) η αναστολή της PARN λόγω της πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης της κυτταροπλασματικής πολυ(A)-δεσμευτικής πρωτεΐνης C (PABPC) με την πολυ(A) ουρά (Gao et al., 2000; Körner et al., 1997), β) ο συναγωνισμός μεταξύ της PARN και του eIF4E για την πρόσδεση στο 5' κάλυμμα (Gao et al., 2001), γ) η αναστολή της PARN από πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο 5' κάλυμμα (cap-binding proteins, CBPs) των mRNA-στόχων, όπως η CBP80 (Balatsos et al., 2006), δ) η διέγερση της PARN μέσω της απευθείας αλληλεπίδρασής της με το 5' κάλυμμα (Martinez et al., 2000; Martinez et al., 2001; Gao et al., 2000), ε) η αλληλεπίδραση της PARN με την CUG-BP mRNA-συνδεόμενη πρωτεΐνη (ανθρώπινο ανάλογο της EDEN-BP του *Xenopus*), μέσω της οποίας διεγείρεται η συντόμευση των πολυ(A) ουρών (Moraes et al., 2006) και στ) η διέγερση της αποικοδόμησης των πολυ(A) ουρών από πρωτεΐνες που συνδέονται σε περιοχές πλούσιες σε AU κατάλοιπα, γνωστές ως ARE (Chen et al., 2001). Στην **εικόνα 5** συνοψίζονται ορισμένοι από τους μηχανισμούς ρύθμισης της PARN που προαναφέρθηκαν.



**Εικόνα 5:** Ρύθμιση της δραστηριότητας της PARN μέσω cis-acting στοιχείων και trans-acting παραγόντων (Virtanen et al., 2013).

## 1.5. Η ρυθμιστική δράση των microRNAs

Τα miRNAs είναι μια κατηγορία ενδογενών, μη-κωδικών RNAs, μήκους 19-25 νουκλεοτιδίων, που μεσολαβούν στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης των mRNAs (Rolle et al., 2016). Είναι εξελικτικά συντηρημένα και ελέγχουν ποικίλες βιολογικές διεργασίες, όπως την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την απόπτωση (Bartel DP, 2004; Chen CZ et al., 2004; He and Hannon, 2004), καθώς επίσης και διάφορες παθολογικές διεργασίες, όπως τον καρκίνο (Gregory and Shiekhhattar, 2005).

Το ώριμο miRNA μπορεί να ελέγξει την έκφραση χιλιάδων mRNA-στόχων, και από την άλλη πλευρά, πιστεύεται ότι ένα μόνο mRNA μπορεί να αποτελέσει στόχο για πολλά miRNAs. Κατά την κανονική οδό, η ρυθμιστική δράση των miRNAs επιτυγχάνεται με τη δέσμευσή τους στα mRNA-στόχους, σε θέσεις που συχνά βρίσκονται στην 3' UTR των τελευταίων. Ωστόσο, έχει ταυτοποιηθεί πως τα miRNAs μπορούν να στοχεύσουν, επίσης, και στις 5' UTR αλλά και στην κωδική περιοχή των mRNAs (Fabian and Sonenberg, 2012).

Η δραστηριότητα του miRNA απαιτεί την ενσωμάτωσή του σε ένα RNA-επαγόμενο σύμπλοκο σίγησης (RISC) (Rolle et al., 2016), το οποίο αποτελείται από μία πρωτεΐνη AGO και την GW182 πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την AGO (Yang W et al., 2006). Το ενεργοποιημένο, στη συνέχεια, miRISC προσδένεται στο mRNA-στόχο μέσω δεσμών Watson-Crick, που δημιουργούνται μεταξύ της 'seed' περιοχής (υπολείμματα 2-8 στο 5' άκρο) του miRNA-οδηγού και της 3' UTR του mRNA-στόχου (Brennecke et al., 2005; Lewis et al., 2003). Ο βαθμός συμπληρωματικότητας μεταξύ του miRNA και του mRNA-στόχου καθορίζει το μηχανισμό δράσης του miRNA, που αντιστοιχεί είτε στην αποικοδόμηση του mRNA-στόχου είτε στην αναστολή της μετάφρασης αυτού, όπου και οι δύο μηχανισμοί οδηγούν στην αρνητική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Yekta et al., 2004; Bartel DP, 2004). Μία σημαντική διαφορά μεταξύ των επιδράσεων των δύο παραπάνω μηχανισμών είναι η αναστρεψιμότητα. Συγκεκριμένα, η αποικοδόμηση του mRNA αποτελεί μία μη-αναστρέψιμη διαδικασία, σε αντίθεση με την αναστολή της μετάφρασης που είναι αναστρέψιμη, καθώς το σταθερό mRNA μπορεί να μεταφραστεί μετά την εξάλειψη της καταστολής της μετάφρασης (Valencia-Sanchez et al., 2006).

Η αποικοδόμηση των mRNAs που κατευθύνεται από microRNA καταλύεται από την πρωτεΐνη Ago2, όταν υπάρχει εκτεταμένη συμπληρωματικότητα μεταξύ του οδηγού miRNA και του mRNA-στόχου. Η αποικοδόμηση των mRNAs ξεκινά με την απαδενυλίωση που διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη GW182, η οποία λειτουργεί ως πλατφόρμα που προσελκύει απαδενυλάσες και αλληλεπιδρά ανεξάρτητα με τα σύμπλοκα απαδενυλίωσης PAN2-PAN3 (PAN) και CCR4-NOT, προωθώντας έτσι τη σταδιακή αφαίρεση των πολυ(A) ουρών των mRNA-στόχων (Yang and Lai, 2011). Μεταγενέστερη αποικοδόμηση μπορεί να υποβληθεί μέσω του εξωσώματος, ενός συμπλόκου πολλαπλών πρωτεϊνών με δραστηριότητα εξωνουκλεάσης 3' - 5', ή εναλλακτικά μέσω της απομάκρυνσης του καλύμματος από τα ένζυμα Dcp1 και

Dcp2, που διευκολύνουν την αποικοδόμηση 5' - 3' από την εξωριβονουκλεάση Xrn1p (Valencia-Sanchez et al., 2006).

Από την άλλη πλευρά, η ύπαρξη πολλαπλών θέσεων με μη πλήρη συμπληρωματικότητα μεταξύ miRNA και mRNA-στόχου, εμποδίζει τη δραστηριότητα της Ago2 και προωθεί ανεξάρτητους από την αποικοδόμηση μηχανισμούς γονιδιακής σίγασης, όπως την αναστολή της μετάφρασης (Pillai, 2005). Η μετάφραση πραγματοποιείται σε τρία στάδια, την έναρξη, την επιμήκυνση και τον τερματισμό, και σε κάθε ένα από αυτά απαιτείται συντονισμός πολλών πρωτεϊνικών παραγόντων (Pillai et al., 2004). Η καταστολή της μετάφρασης από τα miRNAs έχει παρατηρηθεί πως μπορεί να συμβεί τόσο στο στάδιο της έναρξης όσο κατά την επιμήκυνση (Pillai, 2005; Petersen et al., 2006). Τέτοιοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την αναστολή της μετάφρασης εμποδίζοντας διεργασίες που εξαρτώνται από την καλύπτρα, όπως η προσέλευση της ριβοσωμικής υπομονάδας 40S στην 5'καλύπτρα, ή την αναστολή της πρόσδεσης των παραγόντων έναρξης (eIFs) με την καλύπτρα. Επιπλέον, έχει δειχθεί πως το σύμπλοκο miRISC μπορεί να παρεμποδίσει τη λειτουργία του παράγοντα έναρξης eIF4E, ή να παρεμβάλλεται σε προγενέστερο βήμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των eIF4E-eIF4G κατά την έναρξη της μετάφρασης (Tomari and Zamore, 2005).

Ένα σχετικά καινούργιο και λιγότερο μελετημένο πεδίο συγκριτικά με την επαρκώς τεκμηριωμένη αρνητική μετα-μεταγραφική ρύθμιση των miRNAs, αποτελεί η θετική ρυθμιστική δράση τους στους mRNA-στόχους. Η θετική ρυθμιστική δράση έχει παρατηρηθεί ως αποτέλεσμα δύο πιθανών δράσεων: μέσω της άμεσης δράσης microRNAs/microRNPs ή μέσω εξάλειψης της καταστολής, με την κατάργηση της δράσης ενός microRNA ή microRNP (Vasudevan, 2011). Η πρώτη σχετική έρευνα που επέδειξε τη θετική ρυθμιστική ικανότητα των miRNAs έγινε πάνω στον ιό της ηπατίτιδας γ, κατά την οποία βρέθηκε πως η έκφραση του κυτταρικού miR-122 έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του ιικού γονιδιώματος (Jopling et al., 2005). Το αποτέλεσμα αυτό υπήρξε το έναυσμα για την ανακάλυψη και εκτενέστερη διερεύνηση της άμεσης και έμμεσης θετικής ρυθμιστικής δράσης των miRNAs, και πράγματι, έρευνες που ακολούθησαν επιβεβαίωσαν πως τα miRNAs μπορούν άμεσα να επάγουν τη μετάφραση συγκεκριμένων mRNA κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες πάνω σε ένα συγκεκριμένο είδος cis ρυθμιστικού στοιχείου στην 5' UTR φυσιολογικών mRNAs, έδειξαν πως μια σειρά από miRNA μπορούν να προσδεθούν στην 5' τερματική επικράτεια πυριμιδινών (5' terminal oligopyrimidine tract 5' TOP) και να επάγουν τη μετάφραση αυτών των mRNAs. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το miR-145, το οποίο προσδένεται και επάγει τη μετάφραση του mRNA της μυοκαρδίνης (Orom et al., 2008).



## 1.6. Σκοπός της εργασίας

Ο στόχος της παρούσας πειραματικής εργασίας είναι να μελετήσουμε το προφίλ έκφρασης ενός εναλλακτικού μεταγράφου της πολυ(Α)-εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης (PARN) στο μεσοθηλίωμα, προκειμένου να διερευνήσουμε την πιθανή λειτουργία του στη βιολογία του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. Αφού αναγνωρισθεί η έκφραση του μεταγράφου, στη συνέχεια θα ελεγχθούν οι κυτταρικές συνθήκες καθώς, επίσης, και η πιθανή εμπλοκή των miRNAs στη ρύθμιση της έκφρασής του.

Για το σκοπό αυτό, θα εξεταστούν δείγματα cDNA από τέσσερις διαφορετικές κυτταρικές σειρές που προέρχονται τόσο από κακοήθες μεσοθηλίωμα, όσο και από μη παθολογικά κύτταρα. Στη συνέχεια, θα αναζητηθούν συνθήκες και παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση του μεταγράφου σε επίπεδο mRNA και την παραγωγή του σε κυτταρικές σειρές, όπως καταστάσεις στρες και microRNAs, αντίστοιχα. Τα επίπεδα του μεταγράφου θα εξεταστούν σε επίπεδο mRNA, όσο και πρωτεΐνης.

## Κεφάλαιο

# 2

## Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1. Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι οι ακόλουθες:

<b>M14K</b>	Καρκινική σειρά κακοήθους πλευριτικού μεσοθηλιώματος.
<b>MSTO</b>	Καρκινική σειρά κακοήθους διφασικού πλευριτικού μεσοθηλιώματος.
<b>ZL34</b>	Καρκινική σειρά κακοήθους πλευριτικού μεσοθηλιώματος.
<b>Met5A</b>	Καρκινική σειρά που έχει προέλθει από φυσιολογικά μεσοθηλιακά κύτταρα που απομονώθηκαν από υπεζωκοτικά υγρά, και στα οποία εισήχθη και υπερεκφράστηκε το πρώιμο αντιγόνο του ιού sv40.

### 2.2. Απομόνωση ολικού RNA με το πρωτόκολλο Tri Reagent της Sigma Aldrich

Για το παρακάτω πρωτόκολλο είναι απαραίτητο να είναι αποστειρωμένο το περιβάλλον όπου θα γίνει το πείραμα, καθώς επίσης και τα εργαλεία που θα χρησιμοποιηθούν. Αποστειρώσαμε, λοιπόν, τον πάγκο εργασίας και τις πιπέτες με αιθανόλη και χρησιμοποιήσαμε φρέσκα αποστειρωμένα tips.

1. Προσθέτουμε 700μl αντιδραστηρίου Tri στα δείγματα κυτάρων και πιπετάρουμε ήπια ώστε να γίνει λύση των κυττάρων. Τα επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 3min.
2. Προσθέτουμε 70μl 1-βρωμο-3-χλωροπροπάνιο (δεσμεύεται στα νουκλεϊκά οξέα) και κάνουμε Vortex για περίπου 15sec.
3. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5-15min, μέχρις ότου ο διαχωρισμός των φάσεων να ολοκληρωθεί. Κατά τον διαχωρισμό, το 1-βρωμο-3-χλωροπροπάνιο προσδένεται στο RNA και έτσι το ολικό RNA μεταπίπτει στην υδατική φάση, ενώ οι πρωτεΐνες στην οργανική.
4. Φυγοκεντρούμε στα 12.000g για 15min, στους 4°C.
5. Απομονώνουμε την υδατική φάση από την οργανική και την μεταφέρουμε σε καινούργιο tube.
6. Προσθέτουμε 350μl 2-προπανόλης και αναδεύουμε καλά με την πιπέτα. Η 2-προπανόλη μειώνει τη διαλυτότητα του RNA στο νερό.
7. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 10min.

8. Φυγοκεντρούμε στα 12.000g για 10min στους 4°C, προκειμένου να καθιζάνει το RNA.
9. Αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο.
10. Προσθέτουμε 1.4ml αιθανόλη 75%, αναδεύουμε πολύ καλά με την πιπέτα και εφαρμόζουμε ήπιο Vortex για περίπου 1min.
11. Επωάζουμε στους -20°C για 20min, ώστε να μειωθεί περαιτέρω η διαλυτότητα του RNA στο νερό.
12. Φυγοκεντρούμε στα 12.000g για 5min στους 4°C, για να καθιζάνει το RNA.
13. Πολύ προσεκτικά αφαιρούμε το υπερκείμενο.
14. Στεγνώνουμε το ίζημα στο Hood αφήνοντας το tube με ανοιχτό καπάκι, αφού πρώτα αποστειρώσουμε με UV. Προσέχουμε να μην στεγνώσει το ίζημα εντελώς, γιατί μετά θα είναι αρκετά δύσκολο να το επαναδιαλύσουμε.
15. Επωάζουμε το ίζημα στο heat block στους 55°C, για 1-2min.
16. Επαναδιαλύουμε το RNA σε ενέσιμο νερό.
17. Το αποθηκεύουμε στους -80°C, όπου μπορεί να διατηρηθεί για περίπου 6 μήνες.

**Μετά την παρασκευή των RNA, κάναμε Nanodrop για να μετρήσουμε τις συγκεντρώσεις και την καθαρότητα των δειγμάτων μας.**

#### **Υλικά-Αντιδραστήρια**

- TRI Buffer
- 1-βρωμο-3χλωροπτοπάνιο (Merck)
- Αιθανόλη (Sigma)
- 2-προπανόλη (Merck)

### **2.3. Πέψη των εκχυλισμάτων RNA με την RQ1 (RNA Qualified) RNase-Free DNase της Promega**

Η RQ1 RNase-Free DNase είναι μια DNase I (ενδονουκλεάση) η οποία καταλύει την αποικοδόμηση τόσο του δίκλωνου όσο και του μονόκλωνου DNA, παράγοντας 3-OH ολιγονουκλεοτίδια, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές όπου η διατήρηση της ακεραιότητας του RNA είναι κρίσιμη.

1. Αρχικά, παρασκευάζουμε τα μείγματα της αντίδρασης. Η ποσότητα κάθε δείγματος RNA είναι ανάλογη με την αντίστοιχη συγκέντρωση:

	M14K	MSTO	ZL34	Met5A
RNA in water	7μl	4.4μl	6μl	5.2μl
RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer	1μl	1μl	1μl	1μl
RQ1 RNase-Free DNase	1.8μl	1.8μl	1.8μl	1.8μl
Nuclease-free water	0.2μl	2.8μl	1.2μl	2μl
<b>Final volume</b>	<b>10μl</b>			



2. Επωάζουμε στους 37°C για 40min.
3. Προσθέτουμε 1μl RQ1 DNase Stop Solution για να τερματίσουμε την αντίδραση.
4. Επωάζουμε στους 65°C για 10min, για να αδρανοποιήσουμε την DNase.
5. Αποθηκεύουμε τα δείγματα στους -80°C.

## 2.4. Παραγωγή cDNA με PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) της Takara

Η παραγωγή cDNA από τις κυτταρικές σειρές M14K, MSTO και ZL34 έγινε χωρίς DNase Treatment, καθώς τα αντίστοιχα RNA που παρασκευάστηκαν ήταν αρκετά καθαρά. Αντίθετα, για την παραγωγή του Met5A cDNA χρησιμοποιήσαμε το DNase Treated RNA Met5A.

1. Αρχικά, παρασκευάζουμε τα μείγματα των αντιδράσεων:

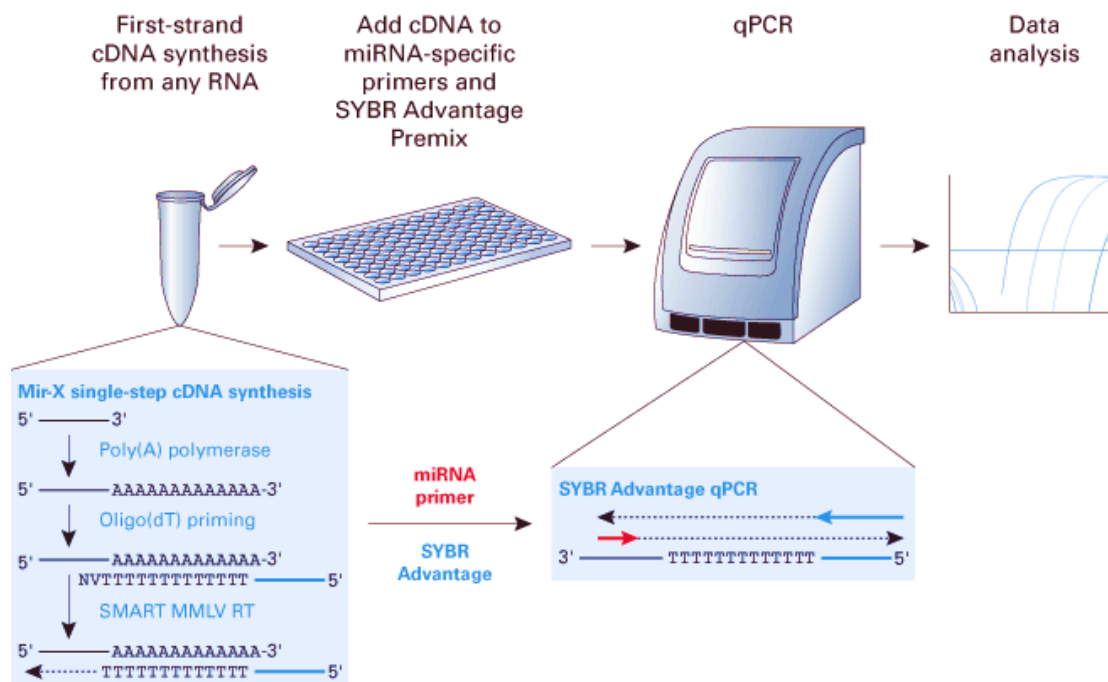
Reagent	V, μl	Reagent	V, μl
5× PrimeScript™ Buffer	6	5× PrimeScript™ Buffer	4
PrimeScript™ RT Enzyme Mix I	1.5	PrimeScript™ RT Enzyme Mix I	1
Oligo dT Primer	1.5	Oligo dT Primer	1
Random 6 mers	1.5	Random 6 mers	1
Total RNA (M14K,MSTO,ZL34)	3	Total RNA (Met5A)	2
RNase Free dH2O	16.5	RNase Free dH2O	11
<b>Final Volume</b>	<b>30</b>	<b>Final Volume</b>	<b>20</b>

2. Επωάζουμε στους 37°C για 15min, για να πραγματοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφή.
3. Επωάζουμε στους 85°C για 5sec, για την αδρανοποίηση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης .
4. Αφήνουμε τα δείγματα στους 4°C.

## 2.5. Παραγωγή cDNA με Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit της Takara

Το συγκεκριμένο Kit χρησιμοποιείται για την μετατροπή των miRNAs και άλλων μορίων RNA σε cDNA, για να καταστεί δυνατή η ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων RNA μέσω της PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR). Σε μία απλή αντίδραση ενός tube, τα μόρια RNA πολυαδενυλιώνονται και μεταγράφονται αντίστροφα με τη χρήση της πολυ(A) πολυμεράσης και της SMART® MMLV αντίστροφης μεταγραφάσης, οι οποίες περιλαμβάνονται και οι δύο στο mRQ Enzyme Mix. Το παραχθέν cDNA, στη συνέχεια, χρησιμοποιείται στην PCR πραγματικού χρόνου με τον mRQ 3' εκκινητή που προσδένεται στις πολυ(A) ουρές και έναν 5'

εκκινητή ειδικό για το miRNA ενδιαφέροντος, με σκοπό να γίνει η ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών miRNA στο cDNA (**Εικόνα 6**).



**Εικόνα 6:** Τα Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR Kits χρησιμοποιούν μια αντίδραση μονού tube για να παράγουν first-strand cDNA σε ένα βήμα, το οποίο στη συνέχεια ενισχύεται ειδικά και ποσοτικά με τη χρήση ενός miRNA-ειδικού εκκινητή και του SYBR Advantage qPCR Premix.

Για την μετατροπή των miRNAs σε cDNA χρησιμοποιήθηκαν DNase Treated RNA από όλες τις κυτταρικές σειρές:

1. Αρχικά, παρασκευάζουμε το μείγμα της αντίδρασης:

Reagent	V, $\mu$ l
mRQ Buffer (2x)	5
RNA sample (M14K,MSTO,ZL34,Met5A)	3.75
mRQ Enzyme	1.25
<b>Final Volume</b>	<b>10</b>

2. Επωάζουμε σε θερμοκυκλοποιητή στους 37 °C για 1 ώρα, για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.
3. Η αντίδραση ολοκληρώνεται στους 85 °C για 5min, όπου θα αδρανοποιηθούν τα ένζυμα (η πολυ(A) πολυμεράση και η αντίστροφη μεταγραφή).
4. Προσθέτουμε 90 $\mu$ l ενέσιμο νερό για να φέρουμε τον τελικό όγκο στα 100 $\mu$ l.

## 2.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Η Real Time PCR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη και εξειδικευμένη τεχνική καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός μεταγράφου ή ακόμα να ανιχνεύσει διαφορετικής έντασης έκφραση μεταξύ δύο δειγμάτων σε ποσοστό έως και 23%. Μπορεί να διεξαχθεί σε ένα βήμα (one step reaction), όπου η όλη διαδικασία από τη σύνθεση του cDNA μέχρι την αντίδραση πολυμεράσης συμβαίνει στο ίδιο tube ή σε δύο βήματα (two-steps) όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA πραγματοποιούνται σε διαφορετικά tubes. Η one step Real time PCR θεωρείται ότι μειώνει την πειραματική απόκλιση γιατί οι ενζυμικές αντιδράσεις συμβαίνουν στο ίδιο tube. Ωστόσο αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί μία αρχική RNA μήτρα η οποία είναι επιρρεπής σε αποικοδόμηση.

Η Real Time PCR επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου σε όλη τη διάρκεια της PCR. Ύστερα από μια αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα, ακολουθεί μία εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια-στόχοι αρχικά στο tube, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να ξεκινήσει η εκθετική φάση. Στη Real Time PCR, η αρχική ποσότητα των μορίων-στόχων προσδιορίζεται μέσω των τιμών Ct. Το Ct (cycle threshold) ορίζεται ως ο αριθμός των κύκλων που απαιτείται για να ξεπεράσει το σήμα φθορισμού το επίπεδο υποβάθρου και για την έλευση της εκθετικής φάσης. Τα επίπεδα Ct είναι αντιστρόφως ανάλογα με την ποσότητα των μορίων-στόχων στα εξεταζόμενα δείγματα, και συγκεκριμένα, όσο χαμηλότερα είναι τα επίπεδα Ct τόσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του μορίου-στόχου στο δείγμα.

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Οι πρώτες ετικέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το βρωμιούχο αιθίδιο και το SYBR Green I. Και τα δύο εισχωρούν στις αύλακες του δίκλωνου DNA.

Στην παρούσα πειραματική εργασία, για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων της απαδενυλάσης PARN, του εναλλακτικού μεταγράφου της και του miR-1207-5p, εφαρμόστηκε συγκριτική ποσοτική Real Time PCR (Comparative qRT-PCR ή qPCR) με τη μέθοδο  $\Delta\Delta Ct$ . Κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο, η κανονικοποίηση γίνεται μέσω τη σύγκρισης του ρυθμού ενίσχυσης των αντίστοιχων δειγμάτων με το ρυθμό ενίσχυσης γονιδίων αναφοράς, τα επίπεδα έκφρασης των οποίων παραμένουν σταθερά. Αναλυτικότερα, τα επίπεδα του mRNA της PARN και του εναλλακτικού μεταγράφου της καθορίστηκαν συγκριτικά με τα επίπεδα της β-ακτίνης, ενώ τα επίπεδα του miR-1207-5p συγκριτικά με τα επίπεδα του U6 snRNA. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων της PARN και του εναλλακτικού μεταγράφου της σε κύτταρα M14K, MSTO, ZL34 και Met5A που επωάστηκαν σε κανονικές συνθήκες (10% FBS) σε σχέση με συνθήκες στέρησης ορού (0.5% FBS για μία μέρα), έγινε σε μία αντίδραση qRT-PCR.

Αντιθέτως, η ποσοτικοποίηση των επιπέδων του miR-1207-5p στις ίδιες κυτταρικές σειρές και κάτω από τις ίδιες συνθήκες (10% FBS – 0.5% FBS), έγινε σε ξεχωριστή αντίδραση qRT-PCR, όπου οι συνθήκες θερμικού προφίλ και οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων ήταν διαφορετικές. Τα δεδομένα αυτά παρατίθενται αναλυτικά στους πίνακες που ακολουθούν.

- Για την ενίσχυση της PARN, του εναλλακτικού μεταγράφου και της β-ακτίνης:

Reagent	V, $\mu$ l
K-SYBR mix	10
Forward primer (10 $\mu$ M)	0.2
Reverse primer (10 $\mu$ M)	0.2
ROX dye LOW	0.4
ddH <sub>2</sub> O	7.7
cDNA	1.5
<b>Final Volume</b>	<b>20</b>

- Για την ενίσχυση του mir-1207-5p και του U6:

Reagent	V, $\mu$ l
K-SYBR mix	10
miRNA-specific 5' primer (10 $\mu$ M)	0.2
mRQ 3' primer (10 $\mu$ M)	0.2
ROX dye LOW	0.4
ddH <sub>2</sub> O	7.2
cDNA	2
<b>Final Volume</b>	<b>20</b>

όπου:

**K-SYBR mix:** μείγμα πολυ(A) πολυμεράσης, dNTPs, ιόντων Mg<sup>2+</sup> και χρωστικής παρακολούθησης SYBR Green.

**miRNA-specific 5' primer:** ο 5' εκκινητής, ο οποίος είναι ειδικός για το miRNA.

**mRQ 3' primer:** ο 3'-oligo(dT) εκκινητής, ο οποίος είναι συμπληρωματικός με την πολυ(A) ουρά του miRNA.

**ROX dye LOW:** η χρωστική αναφοράς, η οποία μειώνει το θόρυβο του μηχανήματος (θερμοκυκλοποιητή).

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, οι αντιδράσεις για την ποσοτικοποίηση των μεταγράφων και του miRNA πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν (triplicates). Για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών, στην αντίδραση συμπεριλήφθηκε και μια NTC αντίδραση, ως αρνητικό control, που στερούνταν δείγματος cDNA (No Template Control).

Οι αλληλουχίες όλων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Εκκινητές	Αλληλουχία
<b>PARN Forward (F1)</b>	CGA GTA GAA CCG CTG AGG C
<b>PARN general Reverse (R2)</b>	ATG CAG AGA CTG AAG GTC CAT C
<b>PARN splice variant Forward (F2)</b>	CGC CGC GGA ATT CGA TTT TAA GAG
<b>B-actin Forward</b>	GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG
<b>B-actin Reverse</b>	AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG
<b>U6 snRNA Forward</b>	GGA ATG ACA CAG TGA AGA TTG G
<b>U6 snRNA Reverse</b>	TTT CCT GTC ATC CTT GCA CA

Ζεύγος εκκινητών	Μήκος προϊόντων
<b>F1R2</b>	190 bp
<b>F2R2</b>	122 bp
<b>B-actin</b>	243 bp
<b>U6 snRNA</b>	51 bp

- Το θερμικό προφίλ του κυκλοποιητή της αντίδρασης qRT-PCR για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης της PARN και του εναλλακτικού μεταγράφου της σε σχέση με την β-ακτίνη είναι:

Τύπος αντίδρασης	Συνθήκες
<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	95 °C, 3min
<b>Ενίσχυση (×38 cycles)</b>	95 °C, 3s
	60 °C, 30s
	72 °C, 11s
<b>Αποδιάταξη</b>	95 °C, 60s
	55 °C, 30s
	95 °C, 30s

- Το θερμικό προφίλ του κυκλοποιητή της αντίδρασης qRT-PCR για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του miR-1207-5p σε σχέση με το U6 snRNA είναι:

Τύπος αντίδρασης	Συνθήκες
<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	95 °C, 10s
<b>Ενίσχυση (×40 cycles)</b>	95 °C, 5s
	60 °C, 20s
<b>Αποδιάταξη</b>	95 °C, 60s
	55 °C, 30s
	95 °C, 30s

Η ανάλυση των δεδομένων μετά την ενίσχυση των δειγμάτων έγινε με το πρόγραμμα MxPro.

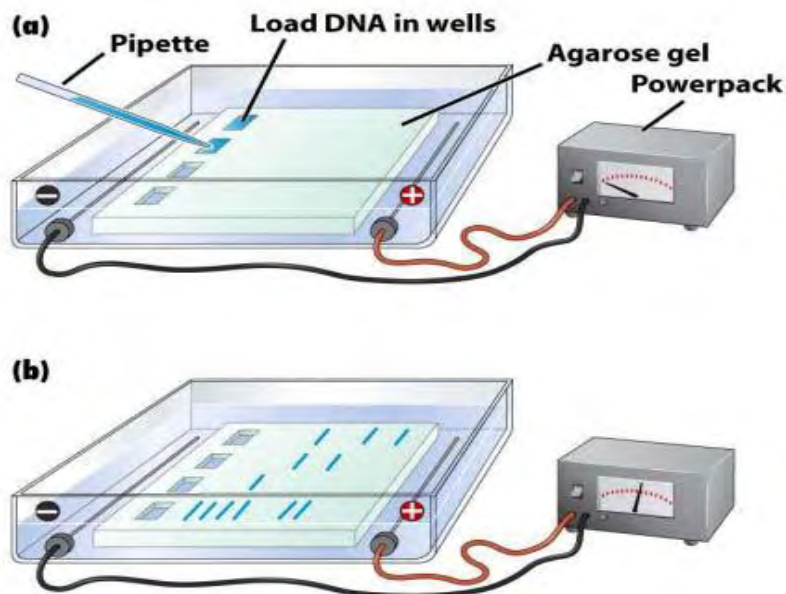
## 2.7. Ανάλυση προϊόντων qRT-PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την πραγματοποίηση των qRT-PCR και την ανάλυση των δεδομένων με τη βοήθεια του προγράμματος MxPro, η επιβεβαίωση των ειδικών προϊόντων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης.

Η τεχνική αυτή, επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων δίκλωνου DNA σε ουδέτερο pH. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Έτσι, το DNA που φέρει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών του ομάδων, τοποθετείται στην κάθοδο(-) και κινείται προς την άνοδο(+). Πολλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό μετανάστευσης του DNA. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου, το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος (δηλαδή η συγκέντρωση της αγαρόζης) και το σημαντικότερο, το μέγεθος των μορίων του DNA. Τα μικρότερα μόρια εμποδίζονται λιγότερο από τους πόρους του πηκτώματος σε σχέση με τα μεγαλύτερα και ως εκ τούτου κινούνται ταχύτερα. Σχηματίζονται, συνεπώς, στο πήκτωμα ζώνες από τα μόρια διαφορετικού μεγέθους, οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν με χρήση υπεριώδους φωτός.

Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης που, σε κατάλληλες συνθήκες, δημιουργεί ένα πορώδες πήκτωμα με πόρους διαμέτρου από 100 έως 300 nm. Η ηλεκτροφόρηση για την ανίχνευση προϊόντων της qRT-PCR που αντιστοιχούν σε εναλλακτικά μετάγραφα έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης 1%, σε μια κωνική φιάλη προστίθενται 100 ml διαλύματος TAE 1x και 1gr αγαρόζης και το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων, μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Αφού κρυώσει λίγο προστίθενται 6ml midori green, το οποίο δρα παρόμοια με το βρωμιούχο αιθίδιο, δηλαδή προσδένεται στο DNA και εκπέμπει στα 540nm όταν φωτιστεί από το UV. Έπειτα, το πήκτωμα τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου. Στο σημείο αυτό, στο πήκτωμα βυθίζεται μια ειδική «χτένα» που δημιουργεί τις υποδοχές των δειγμάτων. Μόλις στερεοποιηθεί το πήκτωμα, η «χτένα» απομακρύνεται και η συσκευή ηλεκτροφόρησης συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x.

Για τον προσδιορισμό των προϊόντων των qRT-PCR, σε κάθε θέση του πηκτώματος τοποθετήθηκαν 20μl DNA και 3.3μl χρωστικής (loading buffer 6x), και η συσκευή ηλεκτροφόρησης ορίστηκε σε τάση γύρω στα 100V. Επιπλέον, σε ξεχωριστή θέση τοποθετήθηκαν και 2.5μl μοριακού μάρτυρα 50 bp. Τέλος, το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε συσκευή UV με σκοπό την παρατήρηση του DNA, λόγω της ύπαρξης του midori green.



**Εικόνα 7:** Ανάλυση δειγμάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτώμα αγαρόζης είναι τα ακόλουθα:

**TAE (Tris-acetate-EDTA) 50x:** Ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτώμα αγαρόζης για το διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων, όπως DNA και RNA. Για την παρασκευή του διαλύματος TAE 50x, διαλύονται 121gr Tris base, 28,5ml ακετοξικό οξύ και 50ml EDTA (0,5M) σε 500ml ddH<sub>2</sub>O. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται TAE 1x, επομένως γίνεται αραίωση του διαλύματος TAE 50x σε ddH<sub>2</sub>O.

**Loading buffer 6x:** Χρησιμοποιείται για να καταστήσει τα δείγματα πυκνότερα από το ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να καθιζάνουν στις θέσεις υποδοχής του πηκτώματος, ενώ περιέχει και χρωστική για την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Για την παρασκευή του, αναμειγνύεται 1ml μπλε της βρωμοφαινόλης 1% w/v με 1ml διαλύματος TBE 10x και 5ml γλυκερόλη 100%, και συμπληρώνεται ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 10ml. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση loading buffer 1x.

### **Υλικά-Αντιδραστήρια**

- **TAE 50x:** Tris base 24,2% v/w, ακετοξικό οξύ 5,71% w/w, EDTA 0,05M, pH 8,6
- **Loading buffer 6x:** Bromophenol Blue 0,09%, Xylene Cyanol 0,09%, Γλυκερόλη 60%, EDTA 60mM
- Αγαρόζη (Sigma)
- DNA μοριακός μάρτυρας 50 bp (Thermo Scientific)
- Midori Green DNA stain (Nippon Genetics)
- Bromophenol blue (Rasearch Organics)
- Xylene Cyanol (Merck)



- Γλυκερόλη (Panreac)
- EDTA (Merck)
- Tris (Merck)
- Ακετοξικό οξύ (Merck)

## 2.8. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting)

### SDS-PAGE

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών των υπό ανάλυση δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου δύο φάσεων (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Η μία φάση του πηκτώματος αποτελεί το Stacking gel (5%), στην οποία έγινε φόρτωση των δειγμάτων των πρωτεϊνών και το «πακετάρισμά» τους στο ίδιο ύψος προκειμένου όλες οι διαδρομές να τρέξουν σύγχρονα. Τη δεύτερη φάση αποτελεί το πήκτωμα διαχωρισμού ή separating gel (8%), όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, κάτω από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου.

Τα συστατικά του διφασικού πηκτώματος καταγράφονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες:

Separating gel 8%	
Reagent	V, ml
H <sub>2</sub> O	2.3
30% acrylamide mix	1.3
1.5M Tris (pH 8.8)	1.3
10% SDS	0.05
10% APS (ammonium persulfate)	0.05
TEMED	0.003
<b>Final Volume</b>	<b>5</b>

Stacking gel 5%	
Reagent	V, ml
H <sub>2</sub> O	3.4
30% acrylamide mix	0.83
1.5M Tris (pH 6.8)	0.63
10% SDS	0.05
10% APS (ammonium persulfate)	0.05
TEMED	0.005
<b>Final Volume</b>	<b>5</b>

Προσθέτουμε τελευταίους και ταυτόχρονα τους καταλύτες APS και TEMED, ώστε να πήξουν τα πηκτώματα.



## Ηλεκτρομεταφορά

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF (ή νιτροκυτταρίνης) είναι γνωστή ως Western blotting. Βασίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS που είναι αρνητικά φορτισμένα, μετακινούνται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προς την άνοδο, εξέρχονται από την πηκτή και καθιλώνονται στη μεμβράνη λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η μεμβράνη και η πηκτή μεταφέρονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer). Στην περίπτωση της PVDF μεμβράνης, προηγείται ένα στάδιο εμβαπτίσεως της μεμβράνης σε 100% μεθανόλη πριν βυθιστεί στο διάλυμα μεταφοράς.

Η τοποθέτησή του gel και της μεμβράνης στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (χρησιμοποιήθηκε Semidry Transfer System) γίνεται ανάμεσα σε τρία ζεύγη από χαρτιά Whatman, με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό. Η επαφή μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης πρέπει να είναι άμεση, χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων που παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στην συγκεκριμένη εργασία έγινε κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 270 mA για 50 min, χρόνος που μπορεί όμως να διαφέρει ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που πρόκειται να μεταφερθούν.

## Ανοσοανίχνευση

Η ανοσοανίχνευση είναι μια τεχνική που επιτρέπει τον εντοπισμό μιας καθηλωμένης σε μεμβράνη πρωτεΐνης με τη βοήθεια αντισώματος. Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι όταν η καθηλωμένη πρωτεΐνη-αντιγόνο αλληλεπιδράσει με το αντίσωμα, μπορεί να ανιχνευτεί με τη βοήθεια ενός δευτέρου αντισώματος, ειδικού για το πρώτο.

Αρχικά η μεμβράνη PVDF μετά την ηλεκτρομεταφορά εμβαπτίζεται υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα σε blocking buffer ώστε να κορεστεί η μεμβράνη από την καζεΐνη του γάλακτος και να αποφευχθούν οι μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα, το ειδικό για την επιθυμητή πρωτεΐνη (στην προκειμένη περίπτωση ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε rabbit anti-PARN με αραιώση 1:500 σε blocking buffer). Κατόπιν η μεμβράνη επώαζεται με το πρώτο αντίσωμα υπό συνεχή ανακίνηση overnight στους 4°C. Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T για 15min η κάθε μία υπό ανάδευση, και στη συνέχεια, επώαση της μεμβράνης επίσης υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία του δευτέρου αντισώματος (φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένη υπεροξειδάση σε θερμοκρασία δωματίου) για 1 ώρα. Ως δεύτερο αντίσωμα στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε goat anti-rabbit IgG-HRP αραιωμένο 1:50000. Της διαδικασίας εμφάνισης του σήματος προηγούνται τρεις πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T για 5min. Η ανίχνευση ειδικού σήματος, στη συνέχεια, οφείλεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας, καθώς το δεύτερο αντίσωμα που είναι ειδικό έναντι rabbit IgG ανοσοσφαιρινών, μετά την προσθήκη κατάλληλου αντιδραστήριου δίνει προϊόν που

παράγει έντονο φως (συγκεκριμένα ως αποτέλεσμα οξείδωσης της λουμινόλης από την υπεροξειδάση), το οποίο μπορεί να αποτυπωθεί σε φωτογραφικό φιλμ με τη μορφή σκοτεινής ζώνης. Τέλος, η εμφάνιση γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του συστήματος ανοσοανίχνευσης ECL ή ECL Plus της Amersham.

### **Υλικά-Αντιδραστήρια**

- Running buffer 10x: 25mM Tris, 192mM Glycine, SDS 0,1%, 500 ml dH<sub>2</sub>O
- Transfer buffer 1x: 10% running buffer 10x, 10% Methanol (100%), dH<sub>2</sub>O
- Blocking buffer: 0,1% Tween, 5% γάλα, PBS 1x
- Washing buffer (PBS-T): 0,1% Tween, PBS 1x
- Protein Loading Buffer 4x: 1M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% bromophenol blue
  
- Acryl-bisacrylamide mix (Merck)
- Tris (Merck)
- SDS (Merck)
- APS (Merck)
- TEMED (Life Invitrogen)
- Glycerol (Merck)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Merck)
- Glycine (Merck)
- Bromophenol blue (Rasearch Organics)
- Methanol (Merck)
- Tween (EuroClone)
- Γάλα σε σκόνη
- Rabbit anti-PARN serum (A.Virtanen)
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Chemicon)
- ECL Plus (Amersham)
- Protein ladder (Nippon Genetics)



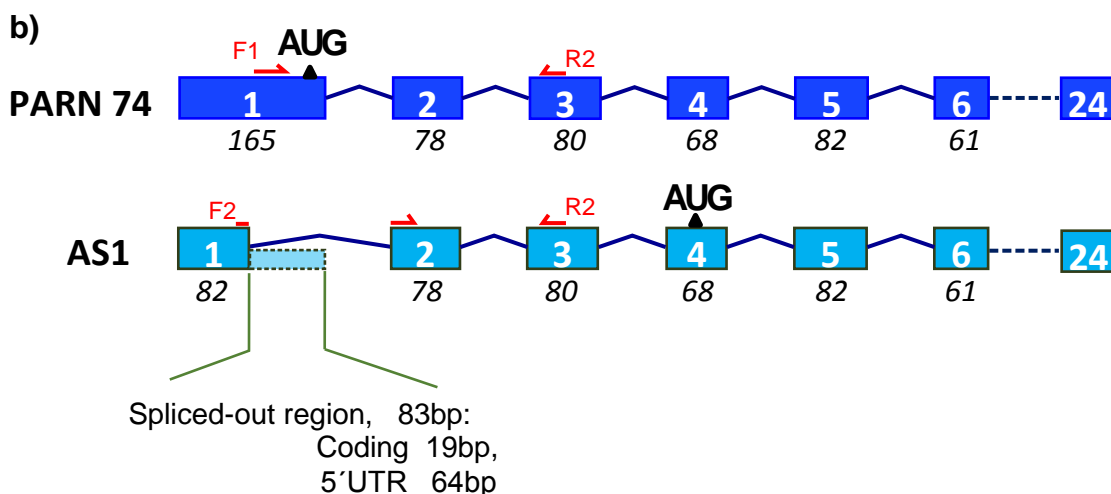
## Αποτελέσματα

### 3.1. Αναζήτηση εναλλακτικού μεταγράφου της PARN σε 4 κυτταρικές σειρές μεσοθηλιώματος

Αρχικά συλλέχθηκαν κύτταρα M14k, ZL34, MSTO που προέρχονται από κακοήθες πλευριτικό μεσοθηλίωμα, καθώς και κύτταρα Met5A από μη καρκινικό υπεζωκοτικό ιστό, και στη συνέχεια έγινε απομόνωση ολικού RNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο Tri Reagent (Sigma Aldrich) και προσδιορισμός της συγκέντρωσής του με Nanodrop. Έπειτα, έγινε η σύνθεση του cDNA για όλες τις κυτταρικές σειρές και ακολούθησε σάρωση αυτών με qPCR, με τα ζεύγη εκκινητών F1R2 και F2R2. Τέλος, τα προϊόντα της qPCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% υπό τάση 100Volt.

Το συγκεκριμένο εναλλακτικό μετάγραφο στερείται μίας περιοχής μήκους 83 ζευγών βάσεων από το εξόνιο 1, σε σχέση με το γνωστό μετάγραφο πλήρους μήκους της PARN. Στο εξόνιο 1, το γνωστό μετάγραφο της PARN στο μεγαλύτερό του μήκος κωδικοποιεί για την 5'αμετάφραστη περιοχή, αλλά περιέχει και μια μικρή περιοχή που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη. Πιο συγκεκριμένα, η εναλλακτική περιοχή περιλαμβάνει 64 ζεύγη βάσεων που αντιστοιχούν σε 5' UTR και 19 ζεύγη βάσεων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνη, συμπεριλαμβάνοντας και το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. Το επόμενο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης που διατηρεί το πλαίσιο ανάγνωσης στο εναλλακτικό μετάγραφο εντοπίζεται στο εξόνιο 4. Έτσι, όλες οι περιοχές ανοδικά του εξονίου 4 μετατρέπονται σε 5' UTR και ως αποτέλεσμα, οι δύο ισομορφές που δημιουργούνται θα διαφέρουν κατά 61 αμινοξέα στο N-τελικό άκρο της PARN. Αυτά τα 61 αμινοξέα είναι μέρος της καταλυτικής περιοχής της PARN και μάλιστα περιλαμβάνουν δύο από τα καταλυτικά αμινοξέα του ενεργού κέντρου του ενζύμου, τα Asp28 και Glu30. Εφόσον, λοιπόν, από την ισομορφή του εναλλακτικού μεταγράφου απουσιάζουν τα δύο πρώτα από τα καταλυτικά αμινοξέα, δεν αναμένεται να έχει ενζυμική δραστηριότητα. Στην **Εικόνα 8** φαίνεται η πλήρης αλληλουχία της PARN (a) καθώς και η σχηματική αναπαράσταση των διαφορών μεταξύ του εναλλακτικού μεταγράφου και του γνωστού μεταγράφου πλήρους μήκους της PARN (b).

a) 1 aggcgcgcgc tgttccgga agtcgcggcc ggcgtcaccg ctgcggctgc ctacgtact  
61 gccgcagtcg ccgcggaatt cggcgcgtag aaccgctgag gcgggcgcgg gcccggggtg  
121 ggccaagggt ccggccactc tgcagatgg agataatcag gagca



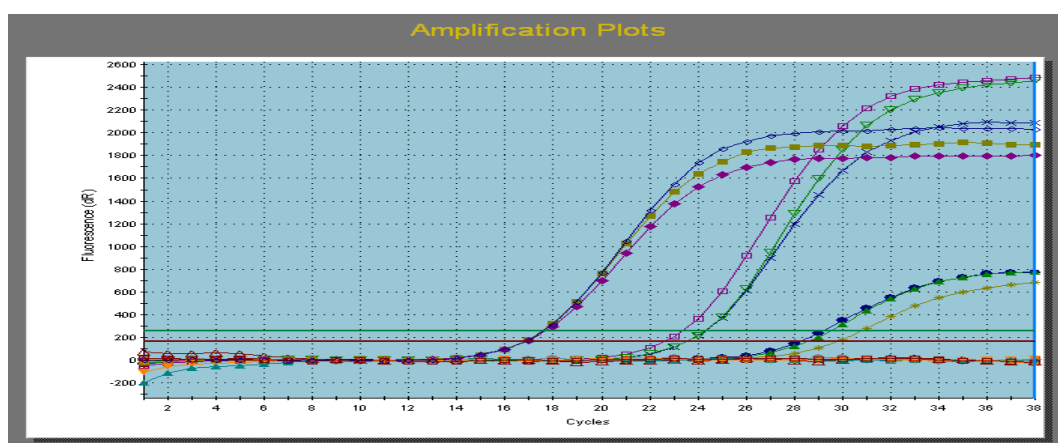
**Εικόνα 8:** α) Αλληλουχία του εξονίου 1 της PARN. Οι χρωματιστές αλληλουχίες αντιστοιχούν στην εναλλακτική περιοχή, όπου με κίτρινο είναι η περιοχή που κωδικοποιεί για ένα μέρος της 5' UTR και με γαλάζιο για πρωτεΐνη. β) Σχηματική αναπαράσταση των διαφορών μεταξύ των δύο μεταγράφων. Κάθε κουτάκι αντιστοιχεί σε ένα εξόνιο και η αρίθμησή τους αντιστοιχεί στα εξόνια του γονιδίου της PARN. Το γνωστό μετάγραφο πλήρους μήκους φαίνεται με μπλε χρώμα ενώ το εναλλακτικό (AS1) με γαλάζιο. Με πιο ανοιχτό γαλάζιο απεικονίζεται η περιοχή που λείπει από το AS1. Έτσι, φαίνεται πως από το εξόνιο 1 του AS1 παραλείπεται μία εναλλακτική περιοχή μήκους 83 ζευγών βάσεων και παραμένει μία περιοχή μήκους 82 bp.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της PARN και του εναλλακτικού μεταγράφου (AS1) παρατίθενται παρακάτω:

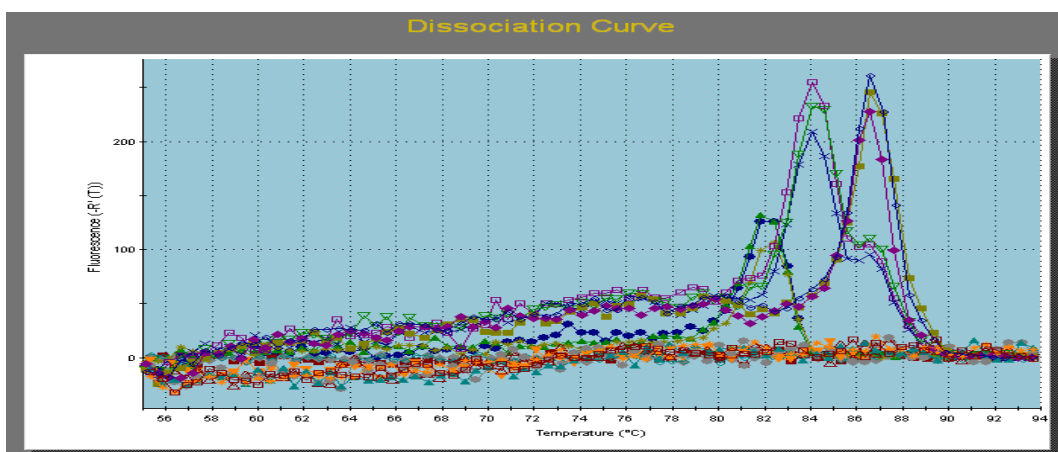
Primer	Sequence	Tm, °C	annealing site
F1	CGA GTA GAA CCG CTG AGG C	55.4	exon 1
F2	CGC CGC GGA ATT CGA TTT TAA GAG	57.8	exon 1-2
R2	ATG CAG AGA CTG AAG GTC CAT C	54.8	exon 3

Στις εικόνες που ακολουθούν (**Εικόνες 9-16**) απεικονίζονται τα διαγράμματα ενίσχυσης και διάστασης σήματος φθορισμού της qRT-PCR με τα ζεύγη εκκινητών F1R2, F2R2 και το ζεύγος εκκινητών που ενισχύει τη β-ακτίνη, για όλες τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές. Τα διαγράμματα ενίσχυσης αποδίδουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού κάθε προϊόντος κατά τη διάρκεια της PCR, ενώ οι τιμές Ct (cycle threshold) ορίζουν τον απαιτούμενο αριθμό κύκλων ώστε το σήμα φθορισμού να ξεπεράσει το επίπεδο υποβάθρου. Τα επίπεδα Ct είναι αντιστρόφως ανάλογα με την ποσότητα των μορίων-στόχων στα εξεταζόμενα δείγματα, και συγκεκριμένα, όσο χαμηλότερα είναι τόσο μεγαλύτερη είναι και η ποσότητα του μορίου-στόχου στο δείγμα. Στα διαγράμματα διάστασης σήματος φθορισμού αποδίδονται τα επίπεδα φθορισμού των προϊόντων, κάθε ένα από τα οποία εμφανίζεται σε συγκεκριμένες κορυφές και θερμοκρασίες.

### Ανίχνευση AS1 και PARN σε καρκινικά κύτταρα M14k

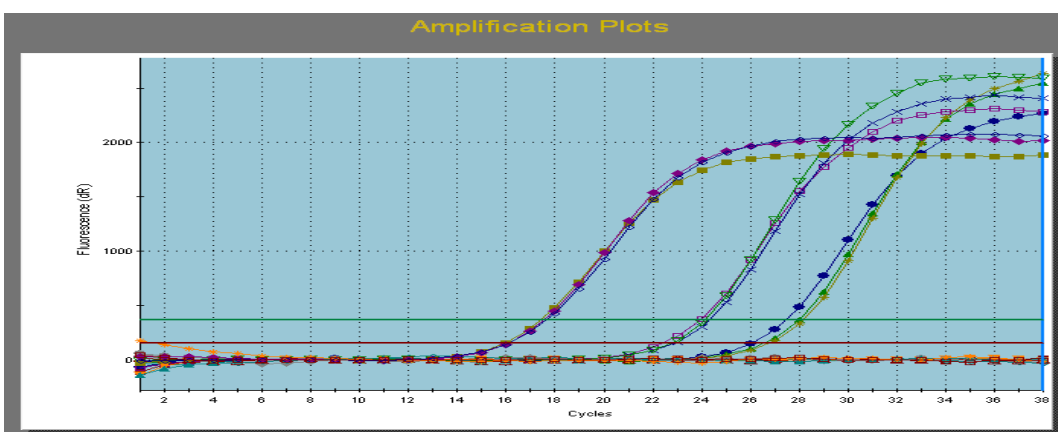


**Εικόνα 9:** Διάγραμμα ενίσχυσης της qRT-PCR με ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το AS1 ( $C_T$  29-31), το γνωστό μετάγραφο της PARN ( $C_T$  22-24) και την β-ακτίνη ( $C_T$  18), στην καρκινική σειρά κυττάρων M14k. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν (triplicates).

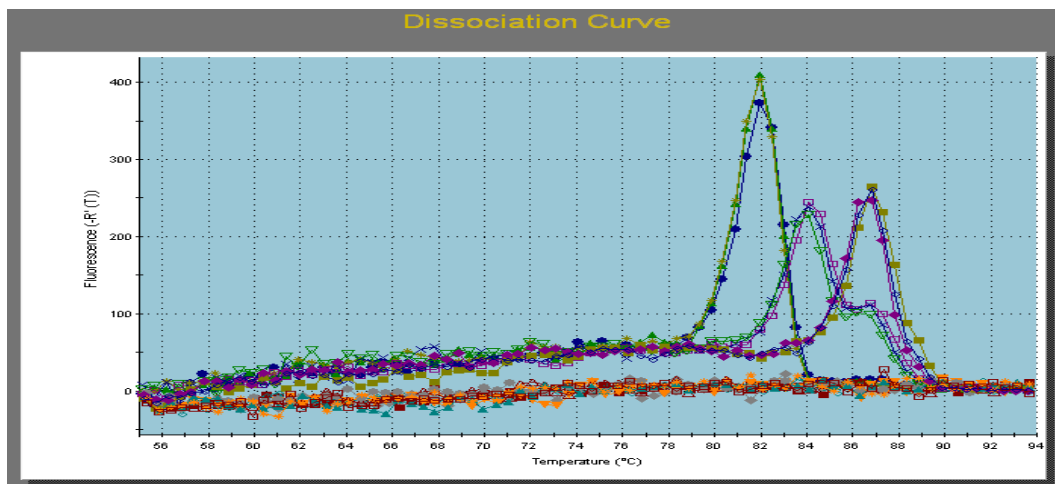


**Εικόνα 10:** Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού της qRT-PCR με τα ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το AS1 (82°C), το γνωστό μετάγραφο της PARN (84°C) και την β-ακτίνη (87°C), στην καρκινική σειρά κυττάρων M14k. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν (triplicates).

### Ανίχνευση AS1 και PARN σε καρκινικά κύτταρα MSTO

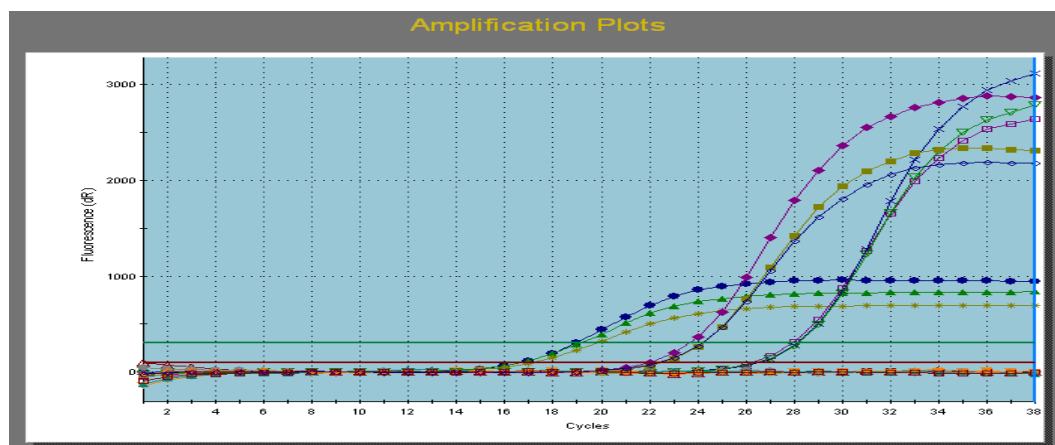


**Εικόνα 11:** Διάγραμμα ενίσχυσης της qRT-PCR με ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το AS1 ( $C_T$  ~28), το γνωστό μετάγραφο της PARN ( $C_T$  24) και την β-ακτίνη ( $C_T$  18), στην καρκινική σειρά κυττάρων MSTO. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν (triplicates).

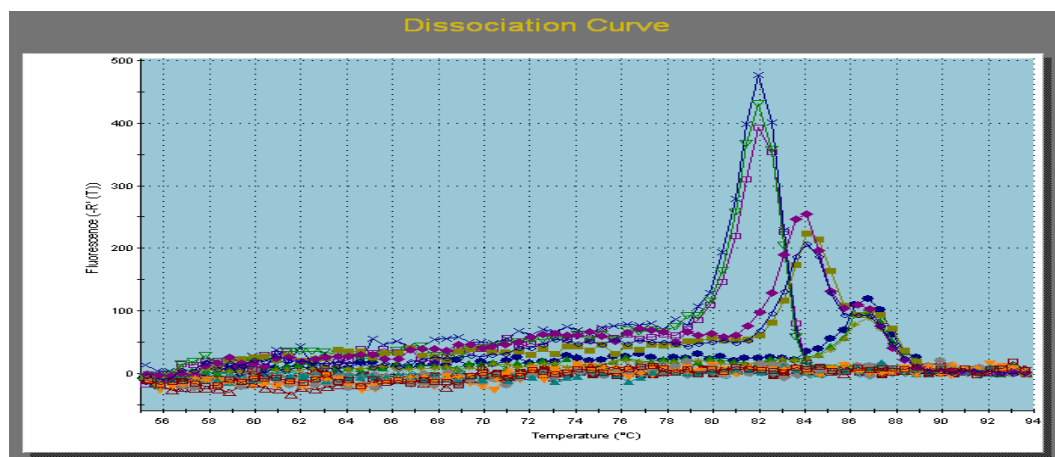


**Εικόνα 12:** Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού της qRT-PCR με τα ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το AS1 (82°C), το γνωστό μετάγραφο της PARN (84°C) και την β-ακτίνη (87°C), στην καρκινική σειρά κυττάρων MSTO. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν (triplicates).

### Ανίχνευση AS1 και PARN σε καρκινικά κύτταρα ZL34

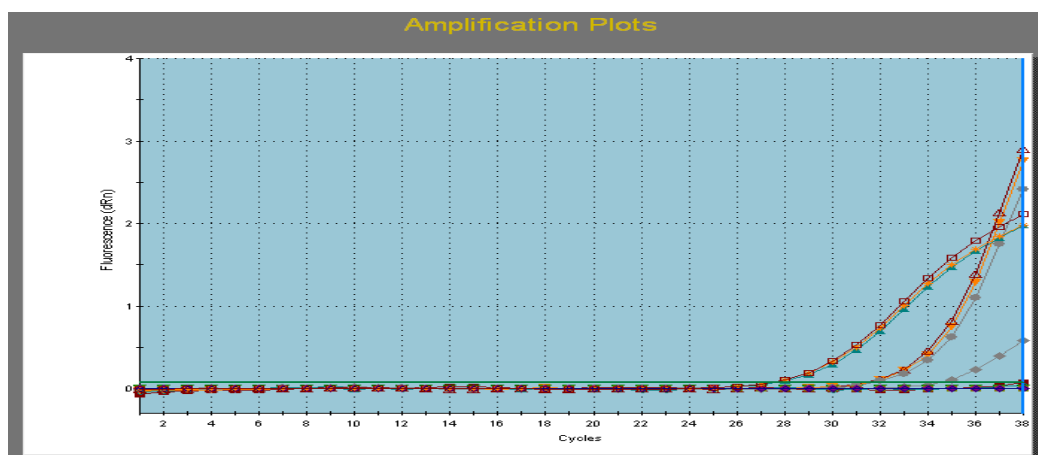


**Εικόνα 13:** Διάγραμμα ενίσχυσης της qRT-PCR με ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το AS1 ( $C_T$  28), το γνωστό μετάγραφο της PARN ( $C_T$  ~24) και την β-ακτίνη ( $C_T$  19), στην καρκινική σειρά κυττάρων ZL34. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν (triplicates).

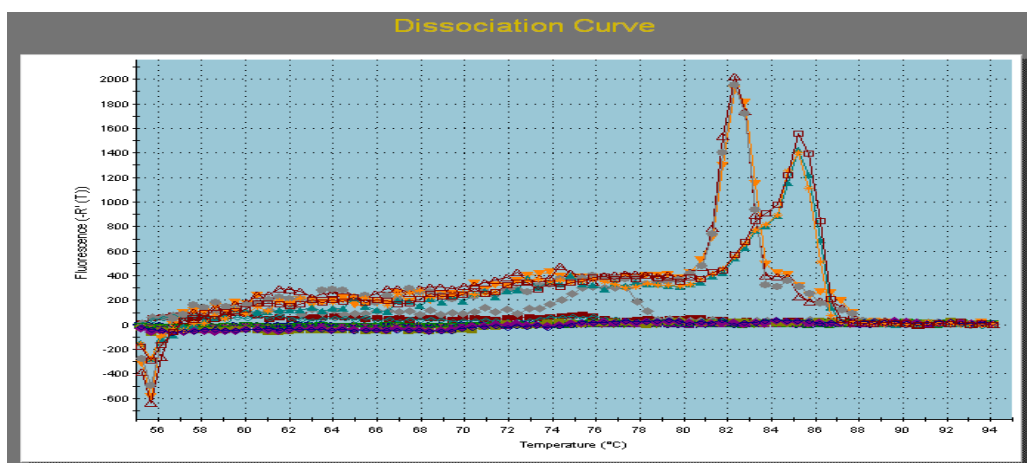


**Εικόνα 14:** Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού της qRT-PCR με τα ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το AS1 (82°C), το γνωστό μετάγραφο της PARN (84°C) και την β-ακτίνη (87°C), στην καρκινική σειρά κυττάρων ZL34. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν (triplicates).

### Ανίχνευση AS1 και PARN σε μη καρκινικά κύτταρα Met5A



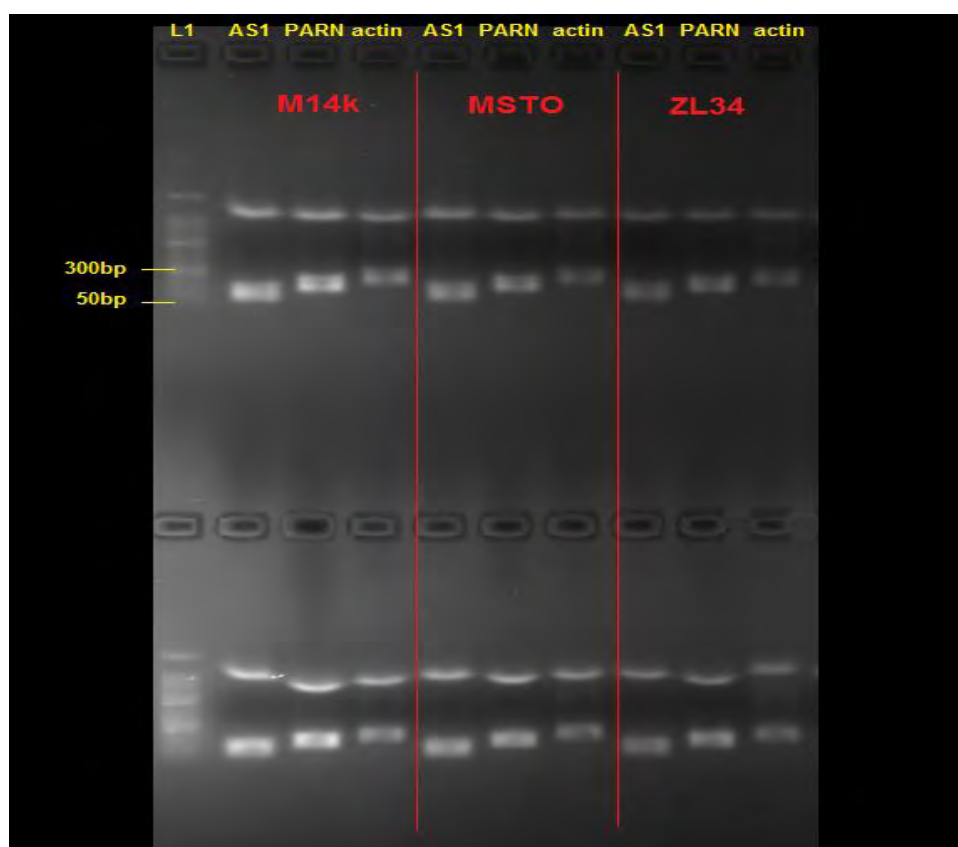
**Εικόνα 15:** Διάγραμμα ενίσχυσης της qRT-PCR με ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το AS1, το γνωστό μεταγράφο της PARN ( $C_T$  32) και την β-ακτίνη ( $C_T$  28), σε μη καρκινικά κύτταρα Met5A. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν (triplicates).



**Εικόνα 16:** Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού της qRT-PCR με τα ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το AS1 (-), το γνωστό μεταγράφο της PARN (82°C) και την β-ακτίνη (85°C), στα μη καρκινικά κύτταρα Met5A. Το AS1 δεν ανιχνεύθηκε στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Η μικρή κορυφή που εμφανίζεται στους 76°C αντιστοιχεί σε μη ειδικό προϊόν, το οποίο ενισχύθηκε στην μία από τις τρεις αντιδράσεις των triplicates με το ζεύγος εκκινήτων που ενισχύει το AS1. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν (triplicates).

Από τις παραπάνω εικόνες, παρατηρούμε πως το AS1 δεν εκφράζεται στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά Met5A (**Εικόνες 15 και 16**). Στις δύο αντιδράσεις τα επίπεδα του AS1 φαίνεται πως είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης, ώστε να ενισχυθεί ( $C_T$  -), ενώ σε μια τρίτη αντίδραση (οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται εις τριπλούν) παρατηρήσαμε την ενίσχυση ενός προϊόντος ( $C_T$  36), το οποίο όμως αντιστοιχεί σε παραπροϊόν, καθόσον ανιχνεύεται σε διαφορετική θερμοκρασία (76°C) από την αναμενόμενη με βάση τα αποτελέσματα από τις προηγούμενες κυτταρικές σειρές (**Εικόνες 9 – 14**).

### Ανάλυση αντιδράσεων qRT-PCR σε πηκτή αγαρόζης

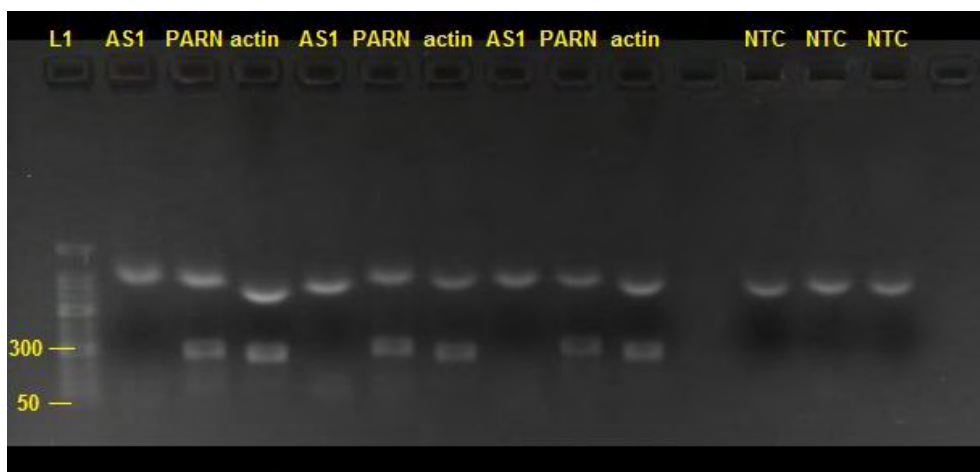


**Εικόνα 17α:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων qRT-PCR με ζεύγη εκκινητών F1R2, F2R2 σε cDNA κυττάρων M14k, MSTO και ZL34 σε κανονικές συνθήκες επώασης (10% FBS). L1: Ladder, AS1 product: 122bp, PARN known transcript: 190bp,  $\beta$ -actin product: 243bp (duplicates). Η «πάνω» ζώνη δημιουργείται από ένα αντιδραστήριο της qRT-PCR (K-SYBR mix) σε συνδυασμό με το loading buffer που χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 17β).



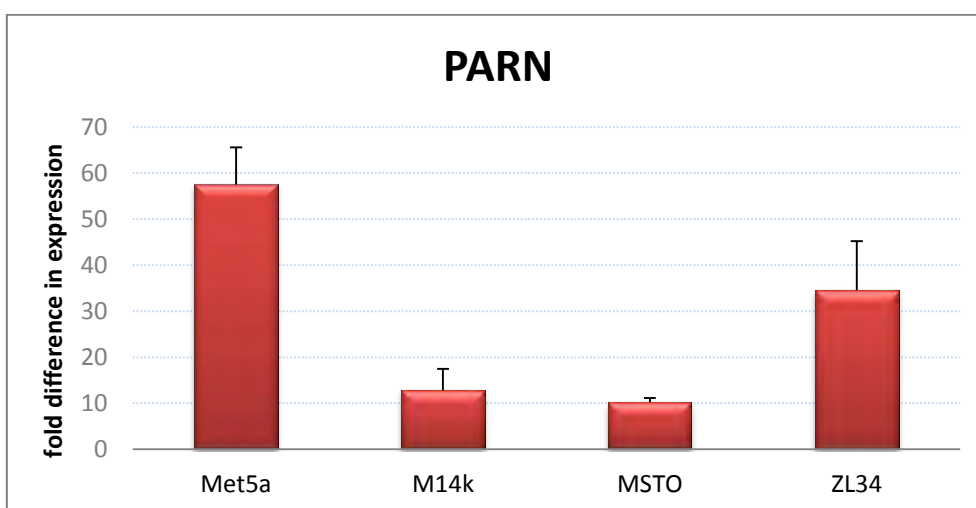
**Εικόνα 17β:** Ηλεκτροφόρηση δύο εκ των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στην qRT-PCR. L1: Ladder, 3<sup>η</sup> διαδρομή: K-SYBR mix + dH<sub>2</sub>O, 4<sup>η</sup> διαδρομή: ROX dye LOW + dH<sub>2</sub>O.



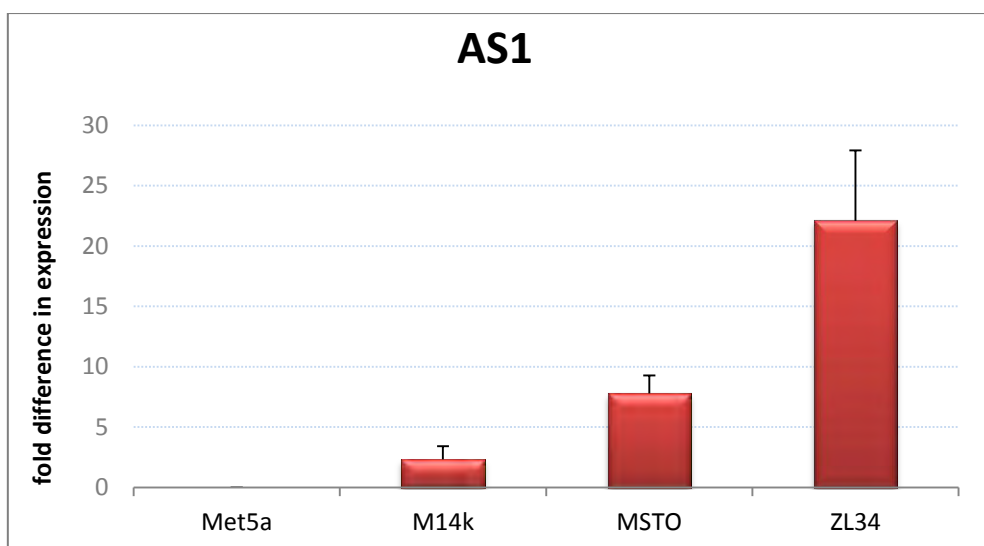


**Εικόνα 18:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων qRT-PCR με ζεύγη εκκινητών F1R2, F2R2 σε cDNA κυττάρων Met5A σε κανονικές συνθήκες επώασης (10% FBS). Ladder, AS1: δεν εκφράζεται, PARN known transcript: >190bp, β-actin product: 243bp, NTC: non-template control (triplicates). Η «πάνω» ζώνη δημιουργείται από ένα αντιδραστήριο της qRT-PCR (K-SYBR mix) σε συνδυασμό με το loading buffer που χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 17β).

Από τις παραπάνω εικόνες (**Εικόνες 17α και 18**) παρατηρούμε πως το ζεύγος εκκινητών F1R2 έδωσε προϊόντα που ταιριάζουν στο προβλεπόμενο μέγεθος του γνωστού μεταγράφου της PARN (190bp) σε cDNA κυττάρων M14k, MSTO, ZL34, ενώ στην περίπτωση των κυττάρων Met5A το αντίστοιχο προϊόν της PARN φαίνεται να έχει μεγαλύτερο μήκος από το αναμενόμενο. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση της β-ακτίνης, όπου το προϊόν της στα cDNA των κυττάρων M14k, MSTO και ZL34 εμφανίζεται στο αναμενόμενο μέγεθος (243bp) ενώ στα κύτταρα Met5A το προϊόν φαίνεται να έχει μεγαλύτερο του προβλεπόμενου μήκος. Το ζεύγος εκκινητών F2R2, στη συνέχεια, έδωσε προϊόντα που ταιριάζουν στο προβλεπόμενο μέγεθος του εναλλακτικού μεταγράφου (AS1) της PARN (122bp) στα cDNA κυττάρων M14k, MSTO, ZL34, ενώ στην περίπτωση των κυττάρων Met5A δεν υπάρχει το αντίστοιχο προϊόν, γεγονός που αφενός συμφωνεί τα δεδομένα της qRT-PCR και αφετέρου επιβεβαιώνει πως στα μη καρκινικά κύτταρα του μεσοθηλιώματος το AS1 δεν εκφράζεται.



**Εικόνα 19:** Η συνολική έκφραση του γνωστού μεταγράφου της PARN στα cDNA όλων των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών.



**Εικόνα 20:** Η συνολική έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου στα cDNA όλων των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών.

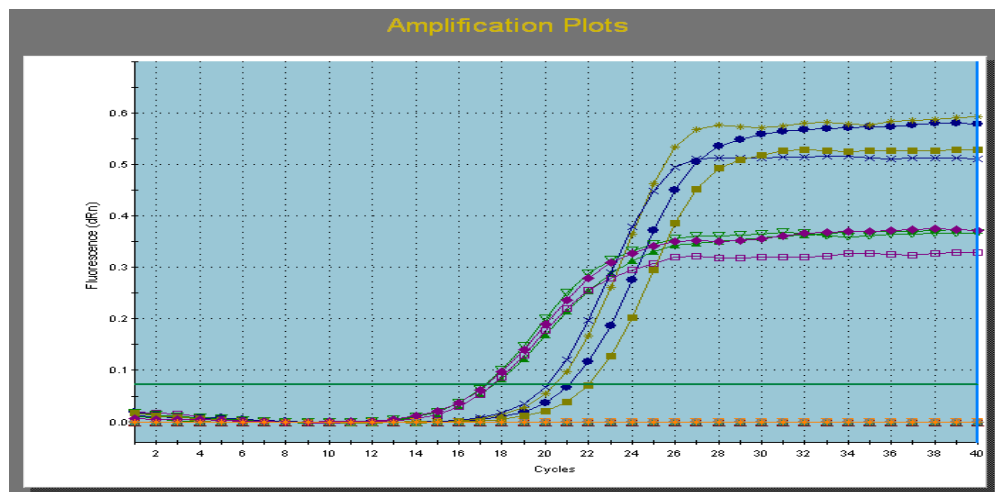
Τα αποτελέσματα δείχνουν πως στα κύτταρα Met5A από φυσιολογικό ιστό παρατηρείται η μέγιστη έκφραση της PARN, ενώ σε όλες τις καρκινικές σειρές η έκφρασή της είναι αρκετά χαμηλότερη, με την ελάχιστη έκφραση να αποδίδεται στα καρκινικά κύτταρα MSTO (**Εικόνα 19**).

Επιπλέον, η **Εικόνα 20** δείχνει πως στα μη καρκινικά κύτταρα Met5A το AS1 είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης, ενώ η έκφρασή του είναι μέγιστη στην καρκινική σειρά ZL34. Ας σημειωθεί, επίσης, πως η έκφραση του AS1 είναι σχεδόν τριπλάσια στα κύτταρα MSTO ενδιάμεσης επιθετικότητας συγκριτικά με τα ήπιας επιθετικότητας M14k, και ακόμη υψηλότερη στα πιο επιθετικά ZL34 (σχεδόν τριπλάσια).

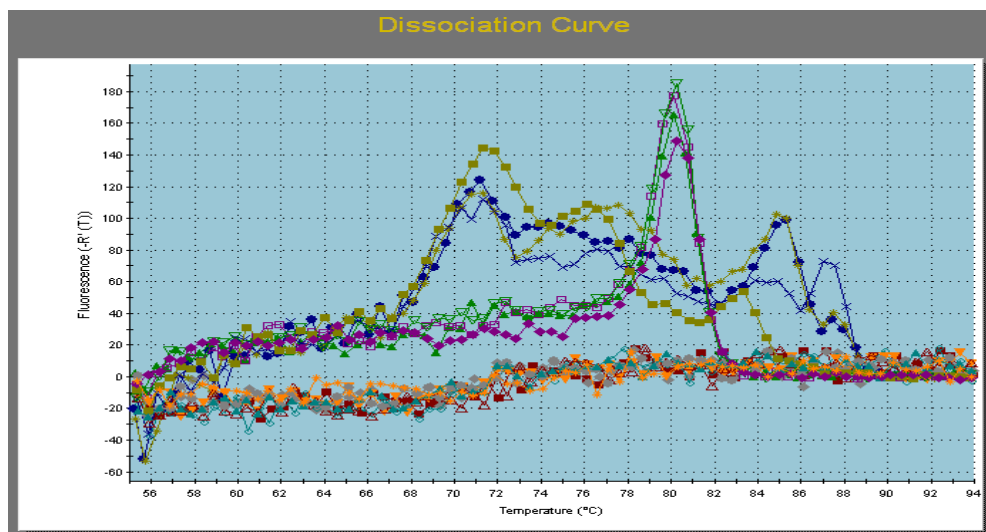
### 3.2. Έλεγχος επιπέδων έκφρασης του miR-1207-5p

Προκαταρκτικές μελέτες του εργαστηρίου έχουν δείξει πως το miR-1207-5p ρυθμίζει την έκφραση της PARN στοχεύοντας στην περιοχή 3' UTR του mRNA (Κυρίτσης Α. και Μπαλατσός Ν., εργασία υπό συγγραφή), και επομένως και του AS1, μιας και η περιοχή αυτή είναι κοινή στα δύο μετάγραφα. Επιπλέον, το miR-1207-5p φαίνεται να στοχεύει και την 5' UTR του mRNA της PARN, αλλά όχι του AS1. Με βάση τα παραπάνω, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης του miR-1207-5p σε όλες τις κυτταρικές σειρές κάτω από φυσιολογικές συνθήκες επώασης (10% FBS). Από το ολικό RNA που απομονώθηκε από κάθε κυτταρική σειρά, έγινε σύνθεση των αντίστοιχων cDNA (Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit, Takara). Τα επίπεδα προσδιορίστηκαν με qRT-PCR και έπειτα, τα προϊόντα της ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% υπό τάση 100V. Παρακάτω φαίνονται τα διαγράμματα ενίσχυσης και διάστασης σήματος φθορισμού για όλες τις κυτταρικές σειρές. Στο διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού (**Εικόνα 22**), οι κορυφές σε θερμοκρασίες

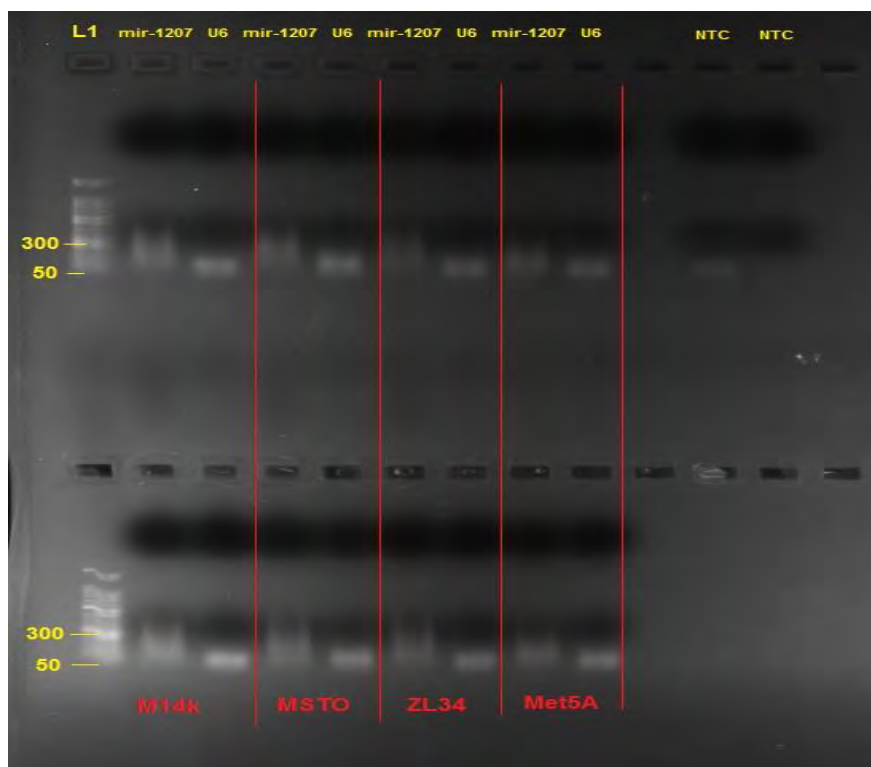
μικρότερες των 74°C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 76°C σε ειδικά προϊόντα.



**Εικόνα 21:** Διάγραμμα ενίσχυσης της qRT-PCR με τα ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το miR-1207-5p ( $C_T$  20-22) και το U6 snRNA ( $C_T$  18), στις 4 διαφορετικές κυτταρικές σειρές.

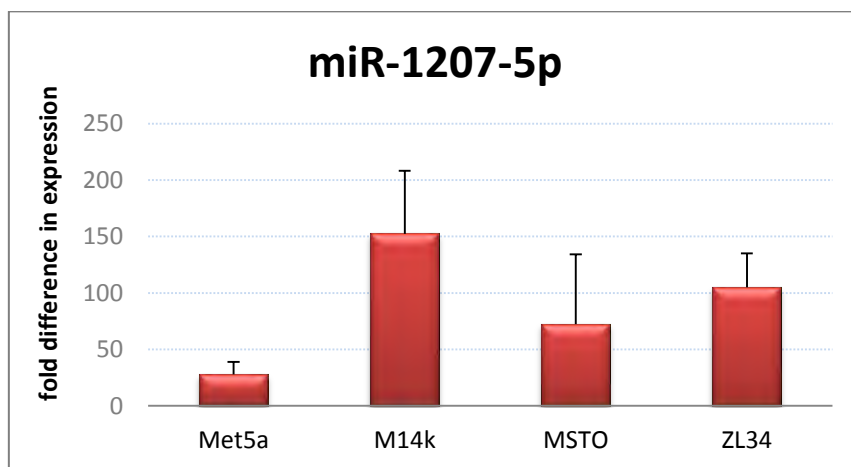


**Εικόνα 22:** Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού της qRT-PCR με τα ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το miR-1207-5p και το U6 snRNA (κορυφή: 80°C), στις 4 διαφορετικές κυτταρικές σειρές.



**Εικόνα 23:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων qRT-PCR σε cDNA από τις υπό εξέταση κυτταρικές σειρές σε κανονικές συνθήκες επώασης (10% FBS), με ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν τα miR-1207-5p και U6 snRNA (duplicates). Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης 1%.

Στην **Εικόνα 23**, το miR-1207-5p δεν ανιχνεύεται ως μια σαφώς εντοπισμένη ζώνη, αλλά εμφανίζεται ως smear, γεγονός που συμφωνεί με το ακανόνιστο πρότυπο έκφρασής του στο διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού (**Εικόνα 22**). Αντίθετα, το U6, το οποίο έχει σταθερή έκφραση και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και παράγοντας κανονικοποίησης, αποδίδεται με την καθαρή και απότομη κορυφή στο διάγραμμα της qRT-PCR (**Εικόνα 22**), και έτσι το συγκεκριμένο προϊόν διακρίνεται ξεκάθαρα στην πηκτή αгарόζης.



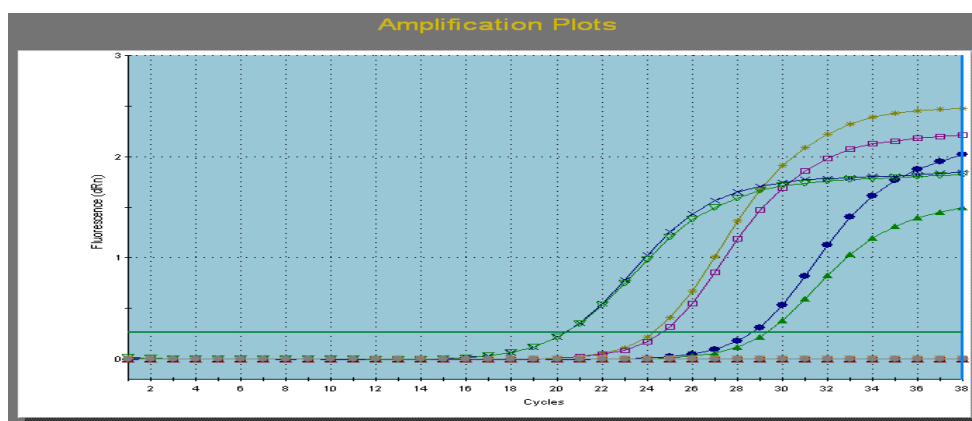
**Εικόνα 24:** Σχετικά επίπεδα έκφρασης του miR-1207-5p σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Η κανονικοποίηση έγινε με το U6 RNA.

Από τα δεδομένα της **Εικόνας 24**, παρατηρούμε ότι η ελάχιστη έκφραση ανιχνεύεται στα κύτταρα Met5A, ενώ στις καρκινικές σειρές είναι αυξημένη.

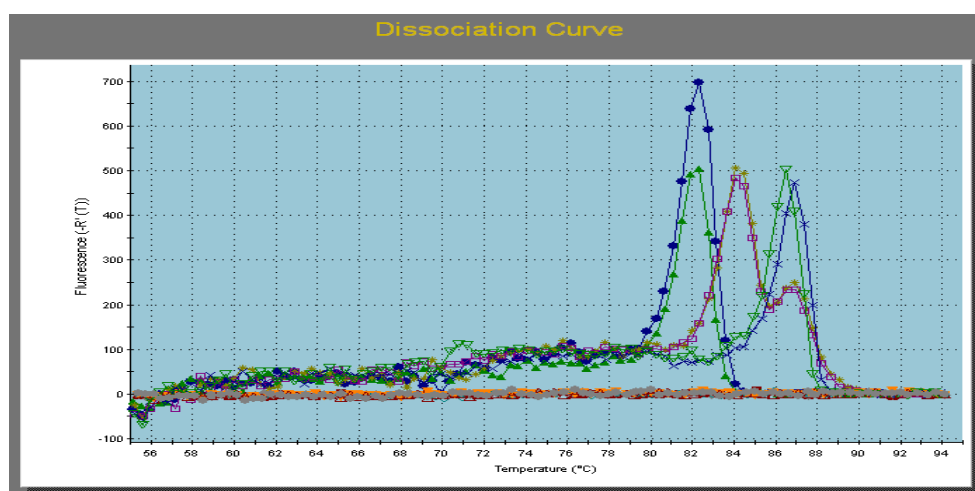
### 3.3. Έλεγχος επιπέδων έκφρασης της PARN και του εναλλακτικού μεταγράφου της σε συνθήκες στέρησης ορού

Προηγούμενες μελέτες δείχνουν πως η δραστηριότητα της PARN επηρεάζεται από συνθήκες στρες (π.χ. στέρηση ορού) (Seal et al., 2005). Στη συνέχεια, ακολούθησε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του γνωστού μεταγράφου και του εναλλακτικού μεταγράφου της PARN σε συνθήκες στέρησης ορού (0.5% FBS). Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε παραγωγή cDNA από κύτταρα M14k, MSTO, ZL34 και Met5A που επωάστηκαν σε μειωμένο θρεπτικό υλικό για μία μέρα. Τα δείγματα, έπειτα, σαρώθηκαν με qRT-PCR με τα ζεύγη εκκινήτων F1R2 και F2R2, και τα προϊόντα της qRT-PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% υπό τάση 100V. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης παρατίθενται στις εικόνες που ακολουθούν.

#### Ανίχνευση AS1 και PARN σε κύτταρα M14k σε συνθήκες στέρησης ορού

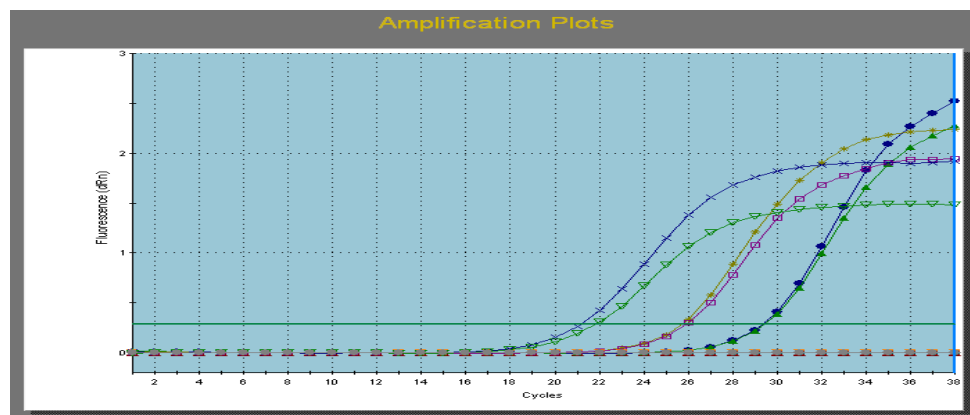


**Εικόνα 25:** Διάγραμμα ενίσχυσης της qRT-PCR με ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το AS1 ( $C_T$  29), το γνωστό μετάγραφο της PARN ( $C_T$  25) και την  $\beta$ -ακτίνη ( $C_T$  21), στην καρκινική σειρά κυττάρων M14k σε συνθήκες στέρησης ορού (duplicates).

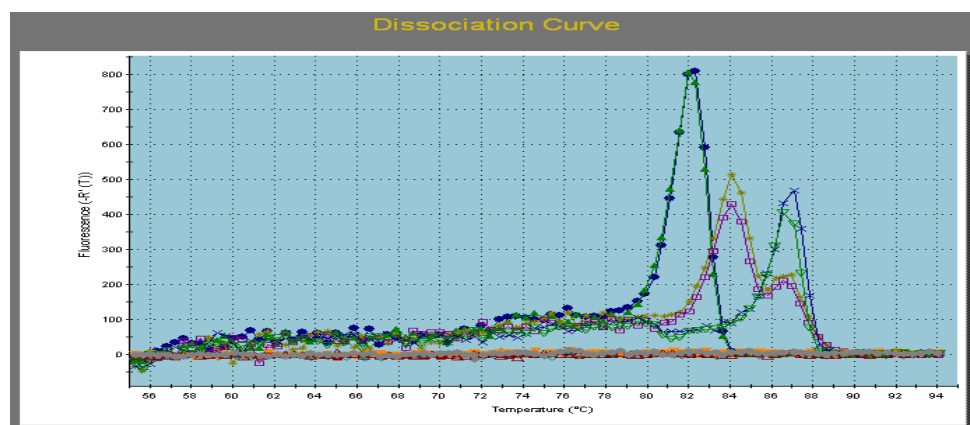


**Εικόνα 26:** Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού της qRT-PCR με τα ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το AS1 (82°C), το γνωστό μετάγραφο της PARN (84°C) και την  $\beta$ -ακτίνη (87°C), στην καρκινική σειρά κυττάρων M14k σε συνθήκες στέρησης ορού (duplicates).

### Ανίχνευση AS1 και PARN σε κύτταρα MSTO σε συνθήκες στέρησης ορού

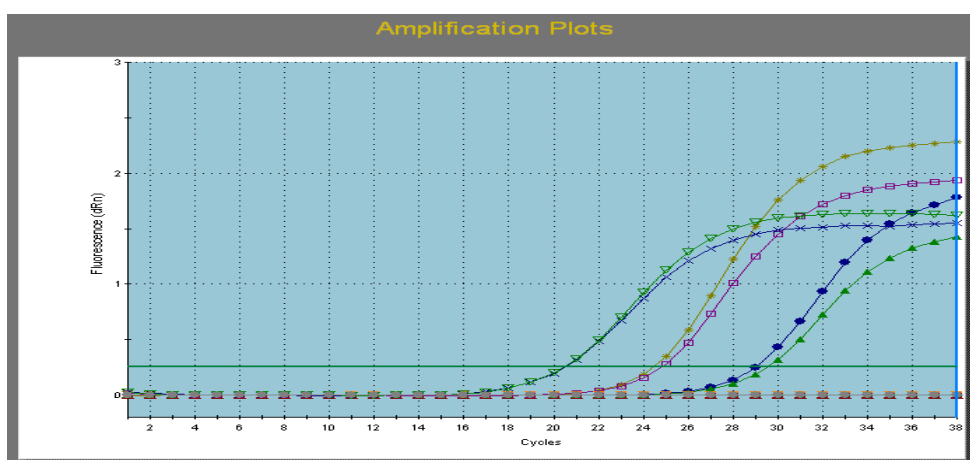


**Εικόνα 27:** Διάγραμμα ενίσχυσης της qRT-PCR με ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το AS1 ( $C_T$  30), το γνωστό μετάργαφο της PARN ( $C_T$  26) και την β-ακτίνη ( $C_T$  22), στην καρκινική σειρά κυττάρων MSTO σε συνθήκες στέρησης ορού (duplicates).



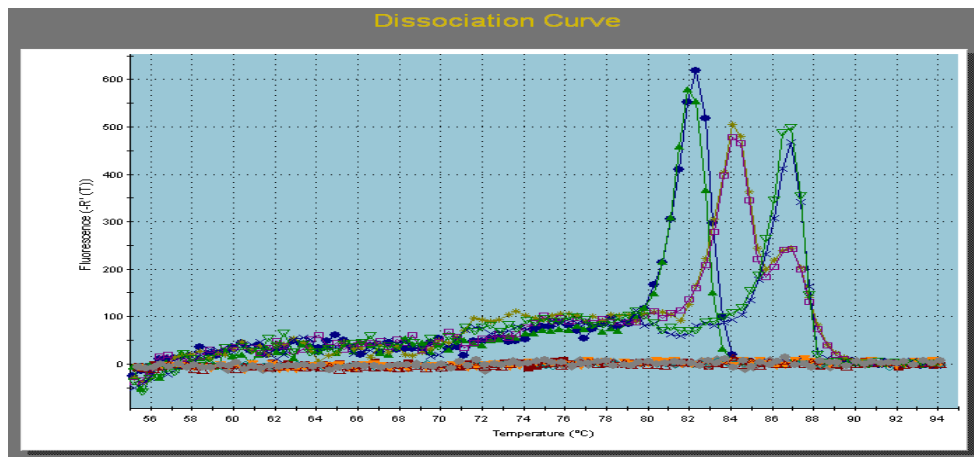
**Εικόνα 28:** Διάγραμμα διάσπασης σήματος φθορισμού της qRT-PCR με τα ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το AS1 (82°C), το γνωστό μετάργαφο της PARN (84°C) και την β-ακτίνη (87°C), στην καρκινική σειρά κυττάρων MSTO σε συνθήκες στέρησης ορού (duplicates).

### Ανίχνευση AS1 και PARN σε κύτταρα ZL34 σε συνθήκες στέρησης ορού



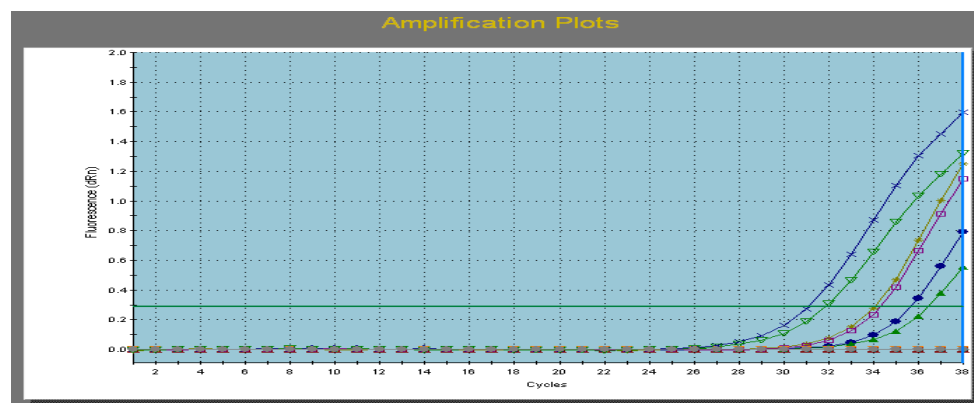
**Εικόνα 29:** Διάγραμμα ενίσχυσης της qRT-PCR με ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το AS1 ( $C_T$  30), το γνωστό μετάργαφο της PARN ( $C_T$  25) και την β-ακτίνη ( $C_T$  21), στην καρκινική σειρά κυττάρων ZL34 σε συνθήκες στέρησης ορού (duplicates).



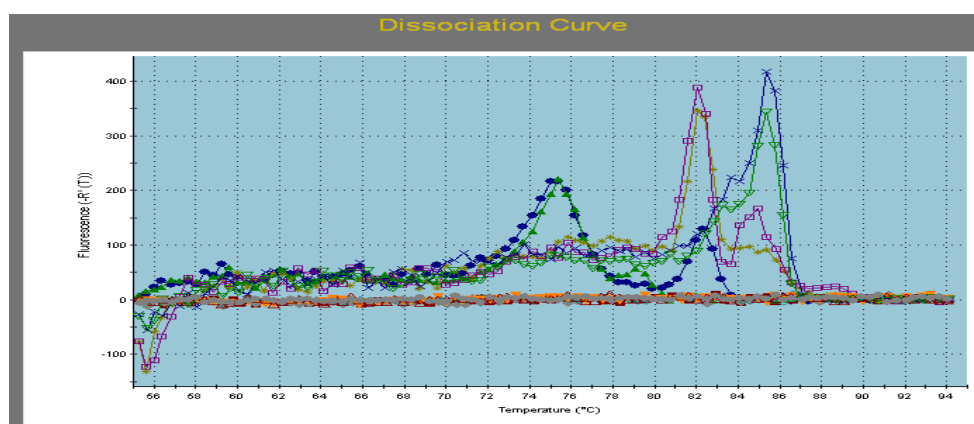


**Εικόνα 30:** Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού της qRT-PCR με τα ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν το AS1 (82°C), το γνωστό μετάγραφο της PARN (84°C) και την β-ακτίνη (87°C), στην καρκινική σειρά κυττάρων ZL34 σε συνθήκες στέρησης ορού (duplicates).

### **Ανίχνευση AS1 και PARN σε κύτταρα Met5A σε συνθήκες στέρησης ορού**

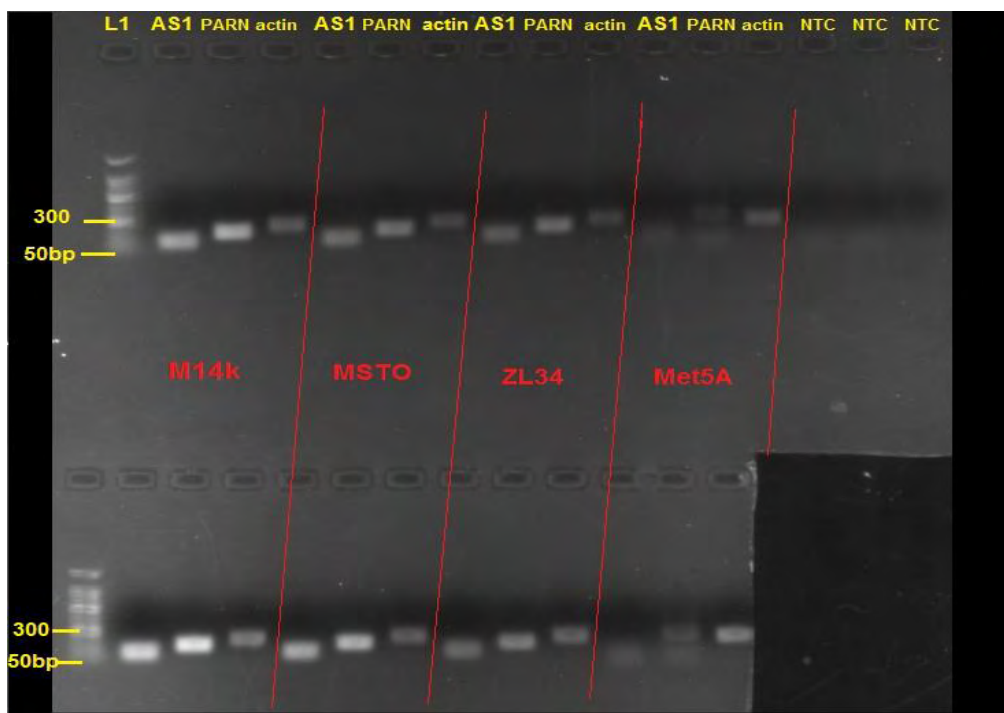


**Εικόνα 31:** Διάγραμμα ενίσχυσης της qRT-PCR με ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν το AS1 (-), το γνωστό μετάγραφο της PARN ( $C_T$  35) και την β-ακτίνη ( $C_T$  31-32), στην μη καρκινική σειρά κυττάρων Met5A σε συνθήκες στέρησης ορού (duplicates). Τα προϊόντα που ενίσχυσε το ζεύγος εκκινητών που κανονικά ενισχύει το AS1 ( $C_T$  36-37), αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα. Το AS1 δεν ανιχνεύθηκε στα μη καρκινικά κύτταρα Met5A.

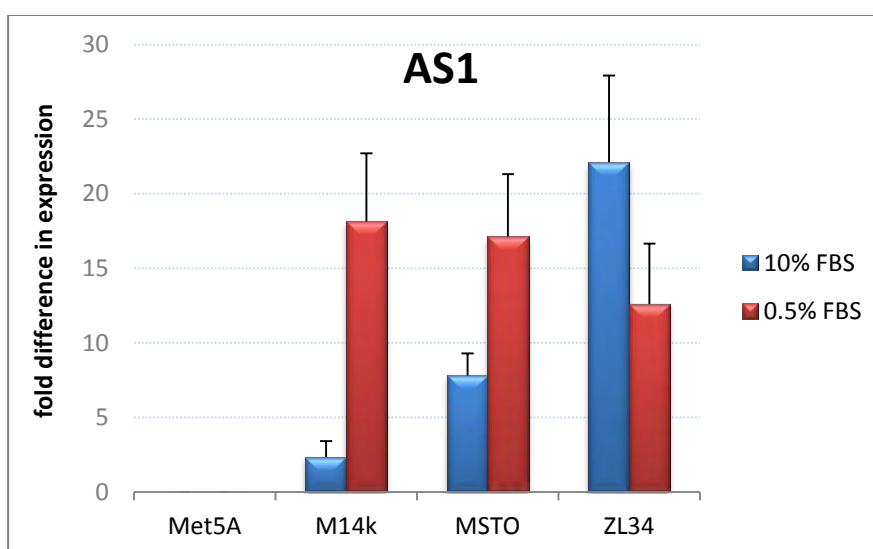


**Εικόνα 32:** Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού της qRT-PCR με τα ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν το AS1 (-), το γνωστό μετάγραφο της PARN (82°C) και την β-ακτίνη (85°C), στην μη καρκινική σειρά κυττάρων Met5A σε συνθήκες στέρησης ορού (duplicates). Η κορυφή που εμφανίζεται στους 75°C αντιστοιχεί σε μη ειδικό προϊόν, το οποίο ενισχύθηκε με το ζεύγος εκκινητών που ενισχύει το AS1. Το AS1 δεν εκφράζεται στα μη καρκινικά κύτταρα Met5A.

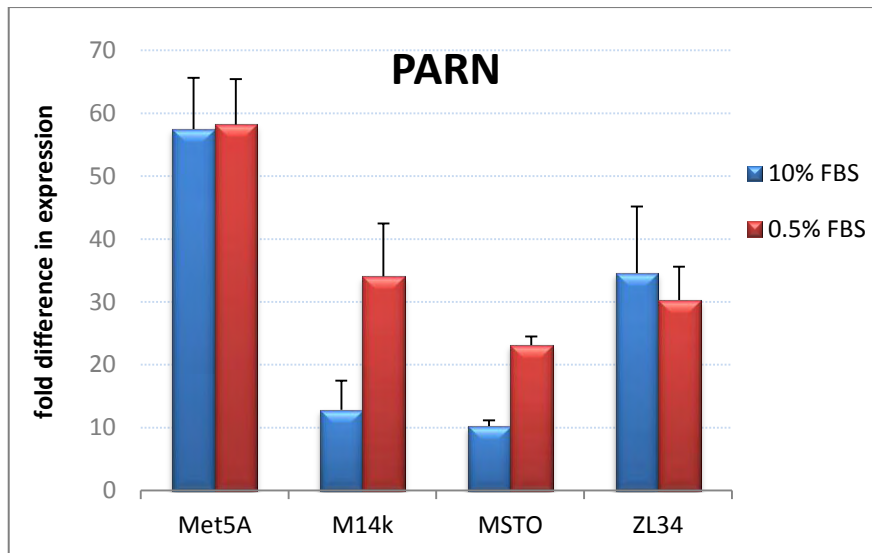
## Ανάλυση αντιδράσεων qRT-PCR σε πηκτή αγαρόζης



**Εικόνα 33:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων qRT-PCR με ζεύγη εκκινήτων F1R2, F2R2 σε cDNA M14k, MSTO, ZL34 και Met5A κυττάρων σε συνθήκες στέρησης ορού (0.5% FBS). L1: Ladder, AS1 product: 122bp, PARN known transcript: 190bp,  $\beta$ -actin product: 243bp (duplicates). Στα κύτταρα Met5A, η μπάντα του AS1 και η κάτω μπάντα της PARN αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα. Επιπλέον, το προϊόν της PARN στα μη καρκινικά Met5A κύτταρα εμφανίζονται σε μεγαλύτερο από το προβλεπόμενο μέγεθος.



**Εικόνα 34:** Η συνολική έκφραση του εναλλακτικού μεταγράψου στα cDNA όλων των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών σε συνθήκες στέρησης ορού (0.5% FBS), συγκριτικά με την αντίστοιχη έκφραση σε φυσιολογικές συνθήκες επώασης (10% FBS).

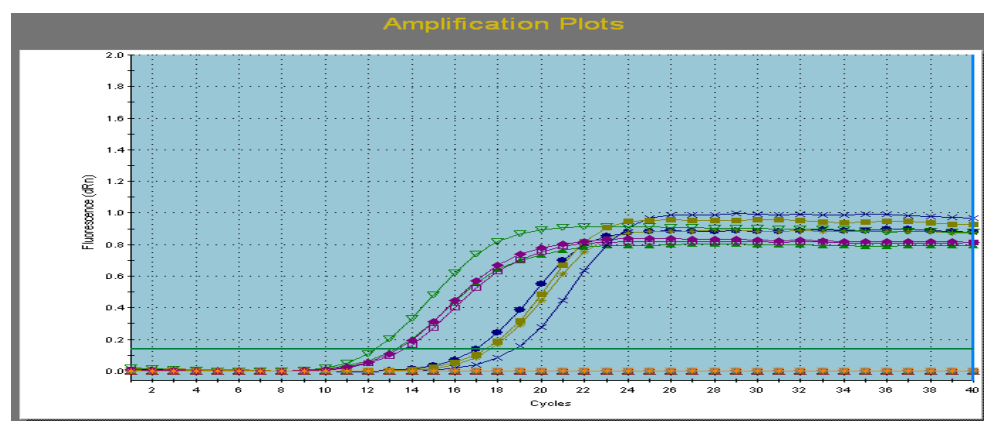


**Εικόνα 35:** Η συνολική έκφραση του γνωστού μεταγράφου της PARN στα cDNA όλων των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών σε συνθήκες στέρησης ορού (0.5% FBS), συγκριτικά με φυσιολογικές συνθήκες επώασης (10% FBS).

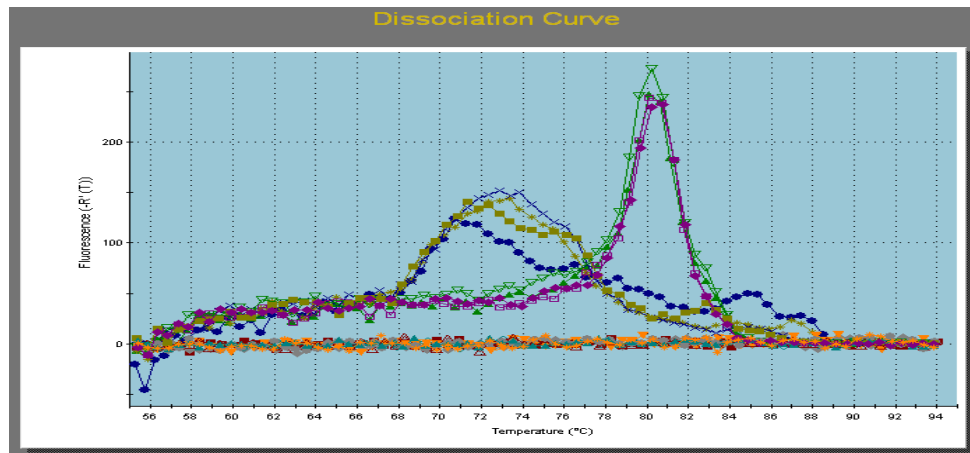
Από τα παραπάνω δεδομένα παρατηρούμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του AS1 σε συνθήκες στέρησης ορού είναι σημαντικά αυξημένα σε σχέση με την έκφραση σε φυσιολογικές συνθήκες, και μειώνονται στις πιο μεταστατικά επιθετικές καρκινικές σειρές. Στα μη καρκινικά κύτταρα Met5A το AS1 δεν φαίνεται να εκφράζεται σε καμία από τις δυο περιπτώσεις (**Εικόνα 34**). Από την άλλη, η μέγιστη έκφραση της PARN αποδίδεται στα μη καρκινικά κύτταρα Met5A και στις δύο συνθήκες επώασης, ενώ στα καρκινικά κύτταρα M14k και MSTO, σε 0.5% FBS τα επίπεδα αυξάνονται σημαντικά συγκριτικά με φυσιολογικές συνθήκες επώασης (10% FBS) (**Εικόνα 35**).

### 3.4. Έλεγχος επιπέδων έκφρασης του miR-1207-5p σε συνθήκες στέρησης ορού

Σε συνθήκες στέρησης ορού ελέγχθηκαν, επίσης, και τα επίπεδα έκφρασης του miR-1207-5p με qRT-PCR. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στις **εικόνες 36, 37**:

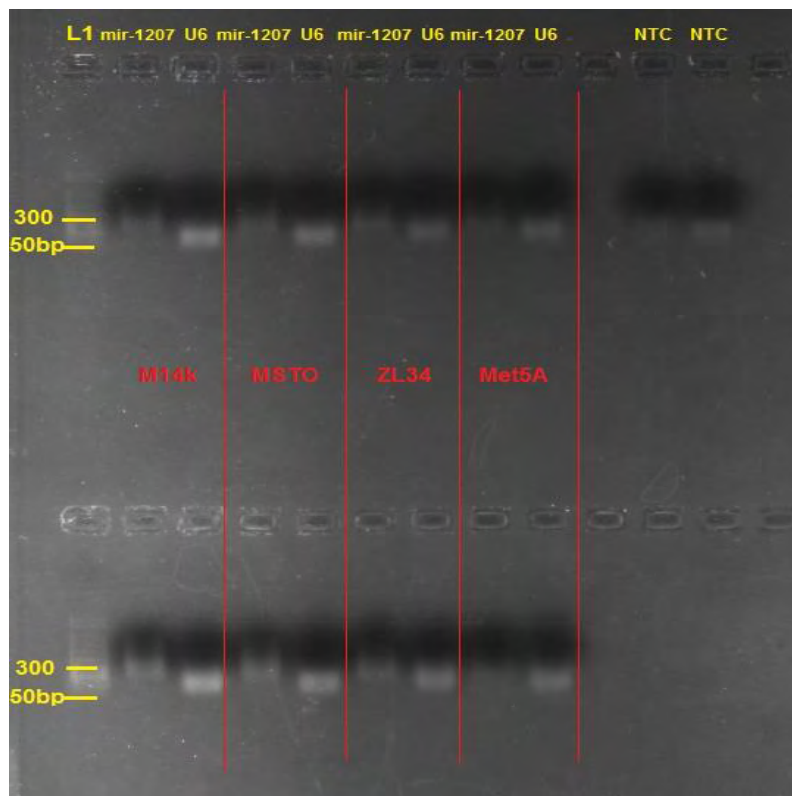


**Εικόνα 36:** Διάγραμμα ενίσχυσης της qRT-PCR με τα ζεύγη εκκινήτων που ενισχύουν το miR-1207-5p ( $C_T$  17-19) και το U6 snRNA ( $C_T$  13-14), στις 4 διαφορετικές σειρές κυτάρων που επώαστηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού.

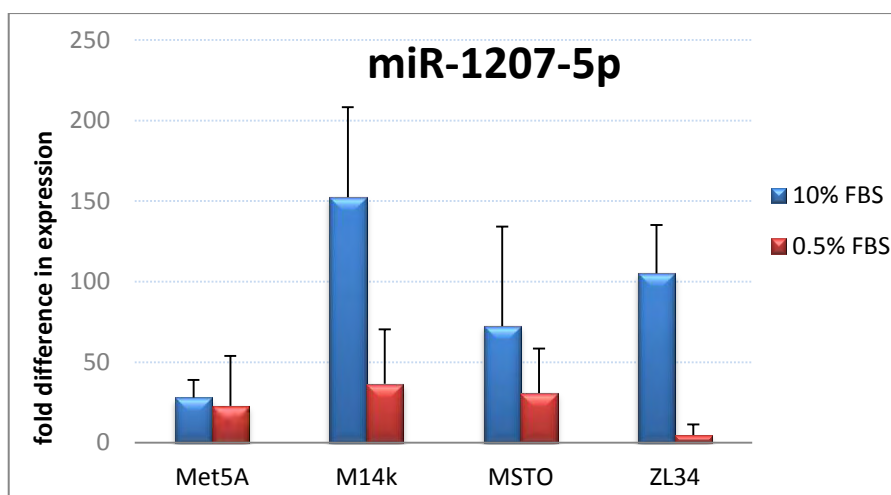


**Εικόνα 37:** Διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού της qRT-PCR με τα ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν το miR-1207-5p και το U6 snRNA (κορυφή: 80°C), στις 4 διαφορετικές κυτταρικές σειρές που επωάστηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού. Οι κορυφές σε θερμοκρασίες μικρότερες των 74°C αντιστοιχούν σε μη ειδικά προϊόντα, ενώ οι κορυφές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 76°C σε ειδικά προϊόντα.

Έπειτα, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της qRT-PCR σε πηκτή αгарόζης 1%, υπό τάση 100V (**Εικόνα 38**).



**Εικόνα 38:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων qRT-PCR σε cDNA όλων των κυτάρων που επωάστηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού (0.5% FBS), με ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν τα miR-1207-5p και U6 snRNA (duplicates).

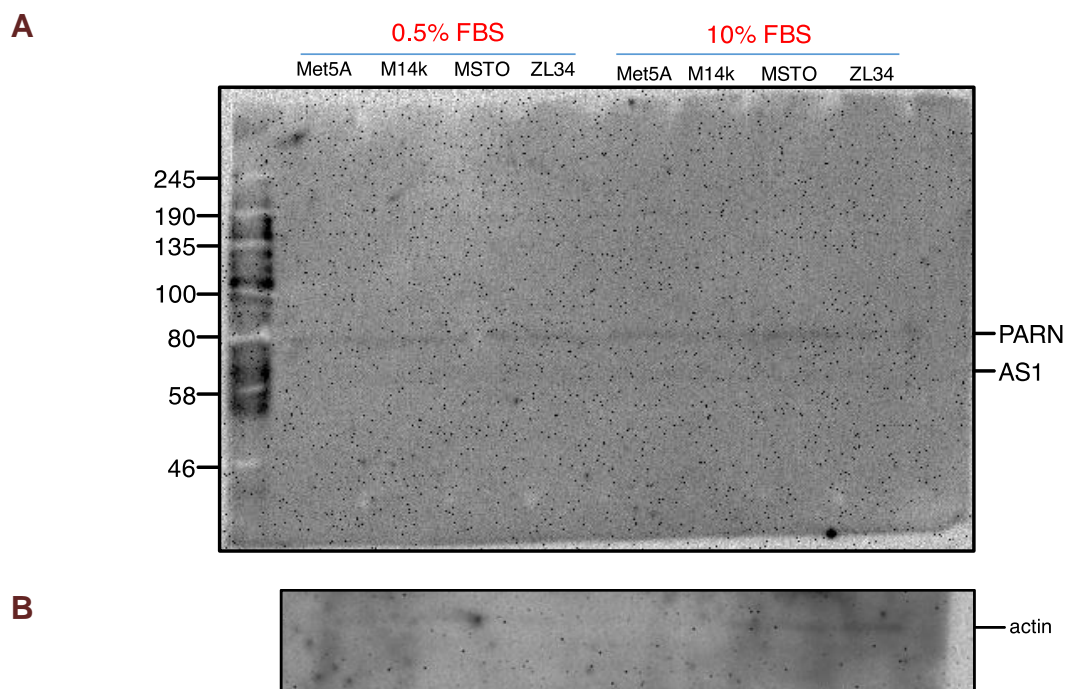


**Εικόνα 39:** Τα συνολικά επίπεδα έκφρασης του miR-1207-5p σε όλες τις κυτταρικές σειρές σε συνθήκες στέρησης ορού (0.5% FBS), σε σύγκριση με την αντίστοιχη έκφραση σε φυσιολογικές συνθήκες επώασης (10% FBS).

Από τα παραπάνω, παρατηρούμε ότι σε 0.5% FBS τα επίπεδα έκφρασης του miR-1207-5p σε όλα τα κύτταρα είναι σημαντικά μειωμένα, με την ελάχιστη έκφραση να παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα ZL34 υψηλής μεταστατικής επιθετικότητας.

### 3.5. Ανοσοαποτύπωση

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν τον εντοπισμό του εναλλακτικού μεταγράφου AS1 της PARN σε επίπεδο mRNA σε κύτταρα από κακοήθες μεσοθηλίωμα. Για να εξετάσουμε αν το AS1 μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western σε αποδιατακτικές συνθήκες με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της PARN σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών από κύτταρα πλευριτικού μεσοθηλιώματος Met5A, M14k, MSTO και ZL34. Τα κύτταρα επώαστηκαν τόσο σε κανονικές συνθήκες (10% FBS) όσο και σε συνθήκες στέρησης ορού (0.5% FBS). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην **Εικόνα 40**, όπου παρατηρούμε την ύπαρξη πρωτεϊνών τόσο της PARN (74kDa) όσο και του AS1 (67kDa). Ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη (actin), η οποία ανιχνεύθηκε με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της beta-actin (43kDa) και ανοσοαποτύπωση στα παραπάνω ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών.



**Εικόνα 40:** **A.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της PARN από ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών από κύτταρα Met5A, M14k, MSTO και ZL34, σε συνθήκες στέρησης ορού (0.5% FBS) και σε κανονικές συνθήκες επώασης (10% FBS). **B.** Ανοσοαποτύπωση των δειγμάτων του (A) με αντίσωμα έναντι β-ακτίνης (actin), η οποία χρησιμοποιείται ως μάρτυρας. Οι αριθμοί στα αριστερά των στυπωμάτων υποδηλώνουν τις μοριακές μάζες μαρτύρων σε kDa.



## Συζήτηση αποτελεσμάτων

Στόχος της παρούσας πειραματικής εργασίας είναι η μελέτη του προτύπου έκφρασης ενός εναλλακτικού μεταγράφου της PARN στο κακοήθες πλευριτικό μεσοθηλίωμα, με σκοπό να διερευνήσουμε τον πιθανή του ρόλο στη βιολογία του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. Για το σκοπό αυτό, απομονώσαμε ολικό RNA από τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές διαφορετικού υποτύπου πλευριτικού μεσοθηλιώματος, τις M14k (επιθηλιοειδές μεσοθηλίωμα, ήπιας επιθετικότητας), MSTO (διφασικό μεσοθηλίωμα, μέτριας επιθετικότητας) και ZL34 (σαρκωματώδες μεσοθηλίωμα, υψηλής επιθετικότητας), καθώς και από μία μη καρκινική σειρά κυττάρων, Met5A. Ακολούθησε σύνθεση cDNA για κάθε κυτταρική σειρά ξεχωριστά και σάρωση των αντίστοιχων δειγμάτων με qRT-PCR. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι η έκφραση του εναλλακτικού μεταγράφου (AS1) είναι σημαντικά αυξημένη στις τρεις σειρές καρκινικής προέλευσης, ενώ αντίθετα, στα κύτταρα Met5A τα επίπεδα έκφρασης του AS1 είναι κάτω από το όριο ευαισθησίας της qRT-PCR και έτσι, μη ανιχνεύσιμα (**Εικόνα 20**). Όπως ήταν αναμενόμενο, στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της qRT-PCR η ζώνη που αντιστοιχεί στο AS1 δεν παρατηρήθηκε στα κύτταρα Met5A αλλά μόνο στις καρκινικές κυτταρικές σειρές (**Εικόνες 17-18**). Διερευνήθηκε, επίσης, και το πρότυπο έκφρασης του μεταγράφου πλήρους μήκους της PARN σε όλες τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές (**Εικόνα 19**). Από την ανάλυση αυτή παρατηρήσαμε ότι η έκφραση της PARN είναι μέγιστη στην μη καρκινική σειρά κυττάρων Met5A, ενώ στις 3 καρκινικές σειρές η έκφρασή της είναι χαμηλότερη.

Η κύρια φαινοτυπική διαφορά μεταξύ των τριών καρκινικών σειρών είναι ότι τα επιθηλιοειδή κύτταρα M14k δεν έχουν υποστεί επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάπτωση (EMT), ενώ αντίθετα ένα μέρος του συνόλου των κυττάρων MSTO διφασικού μεσοθηλιώματος έχει υποστεί EMT και τα σαρκωματώδη κύτταρα ZL34 έχουν όλα μεσεγχυματικό φαινότυπο. Η ενεργοποίηση της EMT αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Η απορρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος έχει δείχθει ότι αποτελεί ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου. Δεδομένου ότι το AS1 ανιχνεύθηκε σε όλες τις καρκινικές σειρές πλευριτικού μεσοθηλιώματος και όχι στα αντίστοιχα μη καρκινικά κύτταρα, συμπεραίνουμε ότι το συγκεκριμένο εναλλακτικό μετάγραφο είναι πιθανό να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι η έκφραση του AS1 είναι σχεδόν τριπλάσια στα κύτταρα MSTO ενδιάμεσης επιθετικότητας συγκριτικά με τα ήπιας επιθετικότητας M14k, και ακόμη υψηλότερη στα πιο επιθετικά ZL34. Τα δεδομένα αυτά, λοιπόν, υποδηλώνουν ότι η

διερεύνηση της έκφρασης του AS1 θα μπορούσε να συσχετίζεται με τη μετάσταση στο πλευριτικό μεσοθελίωμα.

Στη συνέχεια, διερευνήσαμε το πρότυπο έκφρασης του μεταγράφου πλήρους μήκους της PARN και του AS1 σε τόσο σε συνθήκες στέρησης ορού (0.5% FBS), όσο και σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης (10% FBS). Η διερεύνηση έγινε καθώς ο ορός περιέχει πολυάριθμους αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες που συμβάλουν στην ενεργοποίηση μονοπατιών, τα οποία ελέγχουν την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Σε συνθήκες στέρησης ορού τα κύτταρα υποβάλλονται σε κατάσταση stress, λόγω της μειωμένης ενεργοποίησης αυτών των μονοπατιών. Από την ανάλυση με qRT-PCR σε όλες τις κυτταρικές σειρές που επωάστηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού, παρατηρήσαμε ότι στο μετάγραφο πλήρους μήκους της PARN τα επίπεδα έκφρασής του δεν μεταβάλλονται σημαντικά και ακολουθούν το ίδιο πρότυπο με τα αντίστοιχα σε 10% FBS, με τη διαφορά όμως ότι στις καρκινικές σειρές κυττάρων M14k και MSTO η έκφρασή του είναι ενισχυμένη (**Εικόνα 35**). Στην περίπτωση του AS1, παρατηρήσαμε ότι η έκφρασή του μεταβάλλεται αρκετά σε διαφορετικές συνθήκες και ότι το πρότυπο έκφρασής του αντιστρέφεται σε σχέση με το πρότυπο έκφρασης που παρατηρήθηκε σε 10% FBS. Συγκεκριμένα, η έκφραση του AS1 σε συνθήκες στέρησης ορού αυξάνεται σημαντικά στις λιγότερο μεταστατικά ενεργές κυτταρικές σειρές (M14k, MSTO), ενώ μειώνεται στα πολύ επιθετικά κύτταρα ZL34 (**Εικόνα 34**). Στην περίπτωση των μη καρκινικών κυττάρων Met5A, παρατηρούμε και πάλι ότι τα επίπεδα έκφρασης του AS1 είναι μη ανιχνεύσιμα και σε 0.5% FBS. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι το AS1 μπορεί να συμβάλλει στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων σε καταστάσεις stress, λόγω έλλειψης αυξητικών παραγόντων. Επιπλέον, η έκφραση του AS1 από τα καρκινικά κύτταρα είναι πιθανό αποτελεί έναν μηχανισμό αντιστάθμισης της μειωμένης σηματοδότησης μονοπατιών επιβίωσης και κυτταρικής αύξησης.

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης πειραματικής εργασίας διερευνήθηκε, επίσης, και η πιθανή εμπλοκή των microRNAs στη ρύθμιση της έκφρασης της PARN και του AS1. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε το miR-1207-5p, για το οποίο προκαταρκτικές μελέτες του εργαστηρίου έχουν δείξει πως παίζει ρόλο στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης της PARN, καθώς στοχεύει εξειδικευμένα στην περιοχή 3' UTR του mRNA της, και προκαλεί την αποικοδόμησή του και την καταστολή της μετάφρασης. Επιπλέον, προκαταρκτικές μελέτες βιοπληροφορικής του εργαστηρίου έχουν δείξει ότι το miR-1207-5p μπορεί να στοχεύει και στην περιοχή 5' UTR του mRNA της PARN, η οποία όμως λείπει από το AS1. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του miR-1207-5p πραγματοποιήθηκε με qRT-PCR στις κυτταρικές σειρές Met5A, M14k, MSTO και ZL34. Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε ότι στις κυτταρικές σειρές Met5A, M14k και MSTO, όσο αυξάνονται τα επίπεδα του miR-1207-5p τόσο μειώνεται η έκφραση του μεταγράφου πλήρους μήκους της PARN και αντίστροφα. Στην καρκινική σειρά κυττάρων ZL34 υψηλής επιθετικότητας το συγκεκριμένο πρότυπο δεν ακολουθείται, καθώς παρατηρείται υψηλή έκφραση του μεταγράφου πλήρους μήκους της PARN παρά την υψηλή έκφραση του miR-1207-5p (**Εικόνες 19, 24**). Στην περίπτωση του AS1, το συγκεκριμένο πρότυπο ακολουθείται μόνο στις καρκινικές σειρές κυττάρων M14k και MSTO (**Εικόνες 20, 24**).

Στη συνέχεια, μελετήσαμε το πρότυπο έκφρασης του miR-1207-5p και σε συνθήκες στέρησης ορού, προκειμένου να εξετάσουμε αν η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης του miR-1207-5p σε διαφορετικές συνθήκες θα επηρέαζε πιθανώς και την έκφραση της PARN. Από την ανάλυση qRT-PCR παρατηρήσαμε πως τα επίπεδα έκφρασης του miR-1207-5p σε 0.5% FBS μειώνονται σημαντικά σε όλες τις καρκινικές σειρές σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης σε 10% FBS, με την ελάχιστη έκφραση να αποδίδεται στα καρκινικά κύτταρα ZL34 υψηλής επιθετικότητας (**Εικόνα 39**). Στην περίπτωση των μη καρκινικών κυττάρων Met5A, σε 0.5% FBS παρατηρείται μία μικρή μείωση στην έκφραση του miR-1207-5p συγκριτικά με την έκφραση σε 10% FBS. Αντίστοιχα, μία μικρή αύξηση παρατηρείται και στην έκφραση του μεταγράφου πλήρους μήκους της PARN στις συγκεκριμένες συνθήκες. Το πρότυπο αυτό ακολουθείται και στις καρκινικές σειρές κυττάρων M14k και MSTO, αλλά όχι στα καρκινικά κύτταρα ZL34, όπως παρατηρήθηκε και σε φυσιολογικές συνθήκες επώασης. Τα δεδομένα αυτά, λοιπόν, αποτελούν μια ένδειξη για τον σημαντικό ρόλο που πιθανώς διαδραματίζει, μεταξύ άλλων, το miR-1207-5p στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της PARN.

Τέλος, εκτός από τον έλεγχο της PARN και του AS1 σε επίπεδο mRNA, έγινε και έλεγχος των επιπέδων πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση (Western blot). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν την ύπαρξη πρωτεϊνών τόσο της PARN (74kDa) όσο και του AS1 (67kDa) σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές (**Εικόνα 40**). Παρατηρούμε, επίσης, ότι τα επίπεδα AS1 είναι αρκετά χαμηλότερα σε σχέση με τα της πλήρους μήκους της PARN, γεγονός που συμφωνεί με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γνωστού μεταγράφου της PARN συγκριτικά με το εναλλακτικό της μετάγραφο. Στην περίπτωση των μη καρκινικών κυττάρων Met5A σε φυσιολογικές συνθήκες επώασης (10% FBS), παρατηρήσαμε την ύπαρξη πρωτεΐνης του AS1 παρά το γεγονός ότι δεν ανιχνεύθηκαν αντίστοιχα επίπεδα mRNA. Αυτό είναι δυνατό να συμβαίνει λόγω μικρής σταθερότητας του AS1 mRNA στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, με αποτέλεσμα το mRNA να μεταφράζεται και να καταστρέφεται γρήγορα αλλά η παραγόμενη πρωτεΐνη να παραμένει.

### **Προοπτικές**

Στην παρούσα εργασία ανιχνεύεται για πρώτη φορά ένα εναλλακτικό μετάγραφο της PARN, που ονομάσαμε AS1, σε κυτταρικές σειρές από κακοήθες μεσοθηλίωμα διαφορετικής επιθετικότητας, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης. Η τελευταία παρατήρηση, δηλαδή η ανίχνευση πρωτεϊνών που πιθανόν αντιστοιχούν στο AS1 έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον μιας και υπαινίσσεται μηχανισμούς ρύθμισης της δράσης του ενζύμου. Καθόσον από το AS1 απουσιάζουν τα δύο πρώτα από τα καταλυτικά αμινοξέα δεν αναμένεται να έχει ενζυμική δραστηριότητα. Παρόλα αυτά η ανίχνευση της πρωτεΐνης που πιθανόν αντιστοιχεί στο AS1 οδηγεί σε ορισμένες υποθέσεις που θα μπορούσαν να αποκαλύπτουν μηχανισμούς ρύθμισης της δραστηριότητας του ενζύμου. Όπως είναι γνωστό από δομικές και κινητικές μελέτες της PARN, το ένζυμο σχηματίζει ολιγομερή, κυρίως ομοδιμερή σύμπλοκα.

Θα μπορούσε λοιπόν το AS1 να σχηματίζει σύμπλοκα με την πλήρους μήκους PARN μειώνοντας τη δραστηριότητά της. Έτσι, ο σχηματισμός συμπλόκων PARN – AS1 θα μπορούσε να μειώνει το διαθέσιμο αριθμό μονομερών PARN και να παρεμποδίζει την προσβασιμότητα των υποστρωμάτων σε αυτά. Σε αυτή την κατεύθυνση η κλωνοποίηση και υπερέκφραση του AS1 σε κατάλληλους φορείς θα μπορούσε να αποκαλύψει το σχηματισμό ετερομερών συμπλόκων. Παράλληλα, η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης γνωστών υποστρωμάτων της PARN (mRNA ογκογονιδίων, μη-κωδικοποιούντων RNA) σε διαμολυσμένα κύτταρα με το AS1 και σε κύτταρα – μάρτυρες, αναμένεται να δώσει απαντήσεις σε αυτή την υπόθεση. Η καταλυτική αποτελεσματικότητα ετερομερών PARN – AS1 μπορεί να ελεγχθεί με κατάλληλα σχεδιασμένα πρωτόκολλα προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας των εν λόγω συμπλόκων.

Επιπλέον, ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο το κύτταρο θα μπορούσε να ελέγχει την PARN, μεταξύ άλλων, θα ήταν μέσω της επαγωγής έκφρασης του miR-1207, το οποίο στοχεύει κυρίως την 5'UTR της PARN, όχι όμως του AS1. Σε συνέχεια των προσεγγίσεων που περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, κατάλληλος πειραματικός σχεδιασμός βασιζόμενος σε κατάλληλους φορείς έκφρασης του miR-1207 και άλλων microRNA, καθώς και παρεμπόδιση της δράσης τους, θα μπορούσε να συμβάλλει στην αποσαφήνιση των παραπάνω ερωτημάτων. Επιπλέον, στο ερώτημα που εγείρεται για το πως σχετίζονται τα παραπάνω με τη διαφορετική έκφραση/παραγωγή του AS1 στην επιθετικότητα του μεσοθηλιώματος, θα μπορούσε να εξεταστεί η ανάλυση της κατατομής έκφρασης mRNA και microRNA που αποτελούν στόχους της PARN στις υπό εξέταση κυτταρικές σειρές, καθώς και σε γονίδια με γνωστό ρόλο στην ανάπτυξη μετάστασης που διαφοροποιούνται μεταξύ των τριών καρκινικών σειρών από μεσοθηλίωμα. Μεταξύ αυτών των microRNAs ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνει το ίδιο το miR-1207-5p, για το οποίο μελέτες από το εργαστήριο που βρίσκονται στο στάδιο της συγγραφής έχουν δείξει πως ελέγχεται από την ίδια την PARN.

Σε κλινικό επίπεδο, θα έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η εξέταση της έκφρασης του AS1, καθώς και άλλων πιθανών εναλλακτικών μεταγράφων, σε κλινικά δείγματα μεσοθηλιώματος. Τα παραπάνω ερωτήματα και υποθέσεις ανοίγουν ενδιαφέρουσες προοπτικές και αντικείμενα μελέτης για το άμεσο μέλλον και αναμένεται να βοηθήσουν στην κατανόηση της βιολογίας του κακοήθους μεσοθηλιώματος συμβάλλοντας στην αντιμετώπισή του.

## Βιβλιογραφία

- Anczuków, O. *et al.* The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 220–8 (2012).
- Andolfo, I. *et al.* Regulation of divalent metal transporter 1 (DMT1) non-IRE isoform by the microRNA Let-7d in erythroid cells. *Haematologica* **95**, 1244–52 (2010).
- Astrom, J., Astrom, A. & Virtanen, A. Properties of a HeLa cell 3' exonuclease specific for degrading poly(A) tails of mammalian mRNA. *J. Biol. Chem.* **267**, 18154–18159 (1992).
- Attanoos, R. L. & Gibbs, A. R. Pathology of malignant mesothelioma. *Histopathology* **30**, 403–18 (1997).
- Balatsos, N. A. A., Nilsson, P., Mazza, C., Cusack, S. & Virtanen, A. Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). *J. Biol. Chem.* **281**, 4517–22 (2006).
- Balatsos, N. A. A., Maragozidis, P., Anastasakis, D. & Stathopoulos, C. Modulation of Poly(A)-specific Ribonuclease (PARN): Current Knowledge and Perspectives. *Curr. Med. Chem.* **19**, 4838–4849 (2012).
- Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–97 (2004).
- Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–97 (2004).
- Boise, L. H., Gottschalk, A. R., Quintáns, J. & Thompson, C. B. Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **200**, 107–21 (1995).
- Braunschweig, U., Gueroussov, S., Plocik, A., Graveley, B. R. & Blencowe, B. J. Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. **152**, 1252–1269 (2014).
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B. & Cohen, S. M. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* **3**, e85 (2005).
- Brinkman, B. M. N. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin. Biochem.* **37**, 584–594 (2004).
- Cartegni, L., Chew, S. L. & Krainer, A. R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 285–98 (2002).
- Chalfant, C. E. *et al.* De Novo Ceramide Regulates the Alternative Splicing of Caspase 9 and Bcl-x in A549 Lung Adenocarcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 12587–12595 (2002).
- Chen, C. Y. *et al.* AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **107**, 451–64 (2001).
- Chen, C.-Z., Li, L., Lodish, H. F. & Bartel, D. P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* **303**, 83–6 (2004).
- Chiba, Y. *et al.* AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in Arabidopsis. *Gene* **328**, 95–102 (2004).
- Clower, C. V. *et al.* The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 1894–9 (2010).
- Coller, J. & Parker, R. Eukaryotic mRNA decapping. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 861–90 (2004).
- Copeland, P. R. & Wormington, M. The mechanism and regulation of deadenylation: identification and characterization of Xenopus PARN. *RNA* **7**, 875–86 (2001).
- Dai, H., Meng, W. & Kaufmann, S. BCL2 Family, Mitochondrial Apoptosis, and Beyond. *Cancer Transl. Med.* **2**, 7 (2016).
- David Elliott and Michael Lodomery. Molecular Biology of RNA. in 138–181 (2015).

- David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P. & Manley, J. L. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* **463**, 364–8 (2010).
- David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P. & Manley, J. L. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* **463**, 364–8 (2010).
- Dlakić, M. Functionally unrelated signalling proteins contain a fold similar to Mg<sup>2+</sup>-dependent endonucleases. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 272–3 (2000).
- Dlamini, Z., Tshidino, S. & Hull, R. Abnormalities in Alternative Splicing of Apoptotic Genes and Cardiovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 27171–27190 (2015).
- Edlich, F. *et al.* Bcl-xL Retrotranslocates Bax from the Mitochondria into the Cytosol. *Cell* **145**, 104–116 (2011).
- Fabian, M. R. & Sonenberg, N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 586–593 (2012).
- Feingold, E. A. *et al.* The ENCODE (ENCyclopedia of DNA Elements) Project. *Science* (80-. ). **306**, 636–640 (2004).
- Gao, M., Fritz, D. T., Ford, L. P. & Wilusz, J. Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Mol. Cell* **5**, 479–88 (2000).
- Gao, M., Wilusz, C. J., Peltz, S. W. & Wilusz, J. A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements. *EMBO J.* **20**, 1134–43 (2001).
- Gardner, C. R. Anticancer drug development based on modulation of the Bcl-2 family core apoptosis mechanism. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **4**, 1157–1177 (2004).
- Ghigna, C., Valacca, C. & Biamonti, G. Alternative splicing and tumor progression. *Curr. Genomics* **9**, 556–70 (2008).
- Ghosh, M., Loper, R., Gelb, M. H. & Leslie, C. C. Identification of the expressed form of human cytosolic phospholipase A2beta (cPLA2beta): cPLA2beta3 is a novel variant localized to mitochondria and early endosomes. *J. Biol. Chem.* **281**, 16615–24 (2006).
- Godwin, A. R., Kojima, S., Green, C. B. & Wilusz, J. Kiss your tail goodbye: The role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1829**, 571–579 (2013).
- Goldstrohm, A. C. & Wickens, M. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 337–344 (2008).
- Goodson, M. L., Jonas, B. A. & Privalsky, M. L. Alternative mRNA splicing of SMRT creates functional diversity by generating corepressor isoforms with different affinities for different nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* **280**, 7493–503 (2005).
- Green, C. B. *et al.* Loss of Nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 9888–93 (2007).
- Gregory, R. I. & Shiekhattar, R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res.* **65**, 3509–12 (2005).
- Hagen, R. M. & Ladomery, M. R. Role of splice variants in the metastatic progression of prostate cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 870–4 (2012).
- Han, G.-S. & Carman, G. M. Characterization of the human LPIN1-encoded phosphatidate phosphatase isoforms. *J. Biol. Chem.* **285**, 14628–38 (2010).
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
- He, L. & Hannon, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 522–31 (2004).
- Hikisz, P. & Kiliańska, Z. M. Puma, a critical mediator of cell death - one decade on from its discovery. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **17**, 646–669 (2012).

- Hoque, M. *et al.* Analysis of alternative cleavage and polyadenylation by 3' region extraction and deep sequencing. *Nat. Methods* **10**, 133–9 (2013).
- Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. & Sarnow, P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**, 1577–81 (2005).
- Keren, H., Lev-Maor, G. & Ast, G. Alternative splicing and evolution: Diversification, exon definition and function. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 345–355 (2010).
- Kim, E., Goren, A. & Ast, G. Alternative splicing: Current perspectives. *BioEssays* **30**, 38–47 (2008).
- Kim, R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 336–343 (2005).
- Kornblihtt, A. R. Promoter usage and alternative splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 262–268 (2005).
- Körner, C. G. *et al.* The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **17**, 5427–37 (1998).
- Körner, C. G. & Wahle, E. Poly(A) Tail Shortening by a Mammalian Poly(A)-specific 3'-Exoribonuclease. *J. Biol. Chem.* **272**, 10448–10456 (1997).
- Le, KQ., Prabhakar, B. S., Hong, W. & Li, L. Alternative splicing as a biomarker and potential target for drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* **36**, 1212–1218 (2015).
- Lee, Y., Rio, D. C., Biology, S. & Biology, C. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu.Rev.Biochem.* 291–323 (2015). doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034316.Mechanisms
- Lejeune, F., Li, X. & Maquat, L. E. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* **12**, 675–87 (2003).
- Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15–20 (2005).
- Lin, J., Tsao, M. & Lin, Y. Differential Impacts of Alternative Splicing Networks on Apoptosis. (2016). doi:10.3390/ijms17122097
- Liu, W.-F., Zhang, A., Cheng, Y., Zhou, H.-M. & Yan, Y.-B. Effect of magnesium ions on the thermal stability of human poly(A)-specific ribonuclease. *FEBS Lett.* **581**, 1047–1052 (2007).
- Martinez, J. *et al.* A 54-kDa fragment of the Poly(A)-specific ribonuclease is an oligomeric, processive, and cap-interacting Poly(A)-specific 3' exonuclease. *J. Biol. Chem.* **275**, 24222–30 (2000).
- Martínez, J., Ren, Y.-G., Nilsson, P., Ehrenberg, M. & Virtanen, A. The mRNA Cap Structure Stimulates Rate of Poly(A) Removal and Amplifies Processivity of Degradation. *J. Biol. Chem.* **276**, 27923–27929 (2001).
- Martínez, J. *et al.* A 54-kDa Fragment of the Poly(A)-specific Ribonuclease Is an Oligomeric, Processive, and Cap-interacting Poly(A)-specific 3' Exonuclease. *J. Biol. Chem.* **275**, 24222–24230 (2000).
- Mercatante, D. R., Bortner, C. D., Cidlowski, J. A. & Kole, R. Modification of alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA in prostate and breast cancer cells. analysis of apoptosis and cell death. *J. Biol. Chem.* **276**, 16411–7 (2001).
- Molin, L. & Puisieux, A. C. elegans homologue of the Caf1 gene, which encodes a subunit of the CCR4-NOT complex, is essential for embryonic and larval development and for meiotic progression. *Gene* **358**, 73–81 (2005).



- Moraes, K. C. M., Wilusz, C. J. & Wilusz, J. CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *RNA* **12**, 1084–91 (2006).
- Morales-Perez, Claudio L. Noviello, C. M. & Hibbs, R. E. Alternative RNA splicing and cancer Sali. *Nature* **4**, 547–566 (2015).
- Morris, J. Z., Hong, A., Lilly, M. A. & Lehmann, R. twin, a CCR4 homolog, regulates cyclin poly(A) tail length to permit *Drosophila* oogenesis. *Development* **132**, 1165–74 (2005).
- Morrison, A. C., Wilson, C. B., Ray, M. & Correll, P. H. Macrophage-stimulating protein, the ligand for the stem cell-derived tyrosine kinase/RON receptor tyrosine kinase, inhibits IL-12 production by primary peritoneal macrophages stimulated with IFN-gamma and lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **172**, 1825–32 (2004).
- Nakano, K. & Vousden, K. H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* **7**, 683–94 (2001).
- Nilsson, P. *et al.* A multifunctional RNA recognition motif in poly(A)-specific ribonuclease with cap and poly(A) binding properties. *J. Biol. Chem.* **282**, 32902–32911 (2007).
- Oltean, S. & Bates, D. O. Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene* **33**, 5311–5318 (2014).
- Opyrchal, M., Anderson, J. R., Sokoloski, K. J., Wilusz, C. J. & Wilusz, J. A cell-free mRNA stability assay reveals conservation of the enzymes and mechanisms of mRNA decay between mosquito and mammalian cell lines. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 1321–34 (2005).
- Ørom, U. A., Nielsen, F. C. & Lund, A. H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* **30**, 460–71 (2008).
- Parker, R. & Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 121–7 (2004).
- Pena, J. C., Thompson, C. B., Recant, W., Vokes, E. E. & Rudin, C. M. Bcl-xL and Bcl-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* **85**, 164–70 (1999).
- Petersen, C. P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J. & Sharp, P. A. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* **21**, 533–42 (2006).
- Pillai, R. S. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* **11**, 1753–61 (2005).
- Pillai, R. S., Artus, C. G. & Filipowicz, W. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* **10**, 1518–25 (2004).
- Plötz, M., Gillissen, B., Hossini, A. M., Daniel, P. T. & Eberle, J. Disruption of the VDAC2–Bak interaction by Bcl-xS mediates efficient induction of apoptosis in melanoma cells. *Cell Death Differ.* **19**, 1928–1938 (2012).
- Remon, J., Reguart, N., Corral, J. & Lianes, P. Malignant pleural mesothelioma: New hope in the horizon with novel therapeutic strategies. *Cancer Treat. Rev.* **41**, 27–34 (2015).
- Rolle, K. *et al.* The Sequence and Structure Determine the Function of Mature Human miRNAs. *PLoS One* **11**, e0151246 (2016).
- Romero, P. R. *et al.* Alternative splicing in concert with protein intrinsic disorder enables increased functional diversity in multicellular organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 8390–5 (2006).
- Royal College of Physicians. *National Lung Cancer Audit Report 2014 (for the audit period 2013)*. **2016**, (2014).
- Seal, R., Temperley R., Wilusz J., Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM. Serum-deprivation stimulates cap-binding by PARN at the expense of eIF4E, consistent with the observed decrease in mRNA stability. *Nucleic Acids Res.* **33**, 376–387 (2005).

- Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B. & Andrews, D. W. Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a008714–a008714 (2013).
- Shi, J., Hu, Z., Pabon, K. & Scotto, K. W. Caffeine regulates alternative splicing in a subset of cancer-associated genes: a role for SC35. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 883–95 (2008).
- Shultz, J. C. & Chalfant, C. E. Emetine and the Alternative Splicing of Bcl-X: Where to next? *Chem. Biol.* **14**, 1313–1314 (2007).
- Tian, B. & Manley, J. L. Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 18–30 (2016).
- Tomari, Y. & Zamore, P. D. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* **19**, 517–29 (2005).
- Travis, W. D. *et al.* The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. *J. Thorac. Oncol.* **10**, 1243–1260 (2015).
- Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J. & Parker, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* **20**, 515–24 (2006).
- Vasudevan, S. Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **3**, 311–330 (2012).
- Venter, J. C. *et al.* The Sequence of the Human Genome. **291**, (2018).
- Vernes, S. C. & Fisher, S. E. Unravelling neurogenetic networks implicated in developmental language disorders. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 1263–1269 (2009).
- Virtanen, A., Henriksson, N., Nilsson, P. & Nissbeck, M. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): An allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 192–209 (2013).
- Wang, J., Smith, P. J., Krainer, A. R. & Zhang, M. Q. Distribution of SR protein exonic splicing enhancer motifs in human protein-coding genes. *Nucleic Acids Res.* **33**, 5053–62 (2005).
- Washio-Oikawa, K. *et al.* Cnot7-null mice exhibit high bone mass phenotype and modulation of BMP actions. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 1217–23 (2007).
- Wojtuszkiewicz, A. *et al.* Pre-mRNA splicing in cancer: the relevance in oncogenesis, treatment and drug resistance. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **11**, 673–689 (2015).
- Wu, M. *et al.* Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J.* **24**, 4082–93 (2005).
- Yan, Y. Bin. Deadenylation: Enzymes, regulation, and functional implications. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **5**, 421–443 (2014).
- Yang, J.-S. & Lai, E. C. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol. Cell* **43**, 892–903 (2011).
- Yang, W. *et al.* Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 13–21 (2006).
- Yekta, S., Shih, I.-H. & Bartel, D. P. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* **304**, 594–6 (2004).
- Zuo, Y. & Deutscher, M. P. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1017–26 (2001).